

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie

diplomová práce

## **Ekotoxikologická studie vybraného léčiva**

## **Ecotoxicological study of the select drug**

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Jitka Vytlačilová

Vedoucí katedry: Prof. RNDr. Luděk Jahodář, CSc.

Hradec Králové, 2009

Dagmar Střílková

Děkuji paní Mgr. Jitce Vytlačilové za odborný dohled, pomoc při zpracování výsledků a cenné informace, které mi byly velkým přínosem při tvorbě diplomové práce.

Tato diplomová práce byla podpořena grantem GAUK č. 105407.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně.  
Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem čerpala, jsou v práci řádně  
citovány a uvedeny v seznamu použité literatury.

.....

Dagmar Střílková

Obsah:

<b>1</b>	<b>Úvod</b>	<b>7</b>
1.1	<u>Cíl práce</u>	9
<b>2</b>	<b>Teoretická část</b>	<b>11</b>
2.1	<u>Ekotoxikologie, ekotoxikologické testy a jejich členění</u>	11
2.2	<u>Legislativa týkající se ekotoxikologie</u>	17
2.3	<u>Nesteroidní protizánětlivé látky (nesteroidní antiflogistika)</u>	19
2.4	<u>Ibuprofen</u>	21
2.5	<u>Testované organismy</u>	24
2.5.1	<i>Selenastrum capricornutum</i>	24
2.5.2	<i>Thamnocephalus platyurus</i>	27
2.5.3	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	31
2.6	<u>Použité testy</u>	35
2.6.1	ALGALTOXKIT F	35
2.6.2	THAMNOTOXKIT F	35
2.6.3	RAPIDTOXKIT	36
2.6.4	PROTOXKIT F	36
2.6.5	MTT test	37
<b>3</b>	<b>Metodika</b>	<b>39</b>
3.1	<u>Pomůcky</u>	39

<b>3.2 <u>ALGALTOXKIT F</u></b>	42
3.2.1 Příprava ředící řady vzorku	42
3.2.2 Příprava kultivačního média pro řasy	42
3.2.3 Příprava řas	43
3.2.4 Přidání řasového inokula	43
3.2.5 Inkubace	44
3.2.6 Vyhodnocení	44
<b>3.3 <u>THAMNOTOXKIT F</u></b>	45
3.3.1 Příprava ředící řady vzorku	45
3.3.2 Příprava standardní vody	45
3.3.3 Líhnutí cyst	46
3.3.4 Plnění testovací destičky	46
3.3.5 Vyhodnocení	47
<b>3.4 <u>RAPIDTOXKIT</u></b>	48
3.4.1 Příprava ředící řady vzorku	48
3.4.2 Líhnutí cyst	48
3.4.3 Průběh vlastního provedení testu	49
3.4.4 Vyhodnocení	49
<b>3.5 <u>PROTOXKIT F</u></b>	51
3.5.1 Příprava ředící řady vzorku	51

3.5.2	Příprava PPY média.....	51
3.5.3	Plnění testovací destičky.....	52
3.5.4	Měření optické hustoty.....	53
3.5.5	Vyhodnocení.....	53
<b>3.6</b>	<b><u>MTT zkouška</u></b> .....	<b>54</b>
3.6.1	Vložení MTT.....	54
3.6.2	Přidání DMSO.....	54
3.6.3	Vyhodnocení.....	54
<b>4</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b><u>ALGALTOXKIT F</u></b> .....	<b>55</b>
<b>4.2</b>	<b><u>THAMNOTOXKIT F</u></b> .....	<b>61</b>
<b>4.3</b>	<b><u>RAPIDTOXKIT</u></b> .....	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b><u>PROTOXKIT F</u></b> .....	<b>68</b>
<b>4.5</b>	<b><u>MTT test</u></b> .....	<b>77</b>
<b>5</b>	<b>Diskuse</b> .....	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>95</b>
<b>7</b>	<b>Seznam literatury</b> .....	<b>97</b>
	<b>Abstrakt česky</b> .....	<b>105</b>
	<b>Abstrakt anglicky</b> .....	<b>106</b>

# 1 Úvod

Rozvojem farmaceutického výzkumu se na trh postupně dostala celá řada nových léčiv.

Léčiva lze definovat jako léčivé látky nebo jejich směsi anebo léčivé přípravky, které jsou určeny k podání lidem nebo zvířatům, nejde – li o doplňkové látky a premixy (1). Jsou navržena tak, aby jednak předcházela a léčila nemoci, jednak pomáhají lidem zůstat zdravými (Cunningham, 2006).

Vývoj samozřejmě s sebou přinesl řadu pozitiv. V současné době je možno léčit dříve nevyléčitelné nemoci.

Dochází k návratu v minulosti používaných léčivých přípravků, které byly pro svůj negativní dopad na zdraví ztaženy z trhu a nyní se po mírné úpravě opět začínají používat v léčbě jiného onemocnění.

Pacienti mají možnost využít pro léčbu jednoho onemocnění větší sortiment léčivých přípravků. Řada přípravků je koncipována tak, aby nemocem předcházela.

Na druhou stranu používání léčiv má svá úskalí. Vedle nežádoucích účinků na člověka mohou léčivé látky také negativně ovlivnit životní prostředí.

Léčiva s prošlou expirací by se měla vrátit zpět do lékárny. Následnou likvidaci tohoto odpadu zajistí firma, která má k tomu ze zákona oprávnění. Bohužel ale ne všechna nevyužitá léčiva skončí v lékárně. Někteří pacienti tuto likvidaci provádí sami tím, že tyto přípravky vyhodí do popelnice, a díky sběru komunálního odpadu pak končí na skládce.

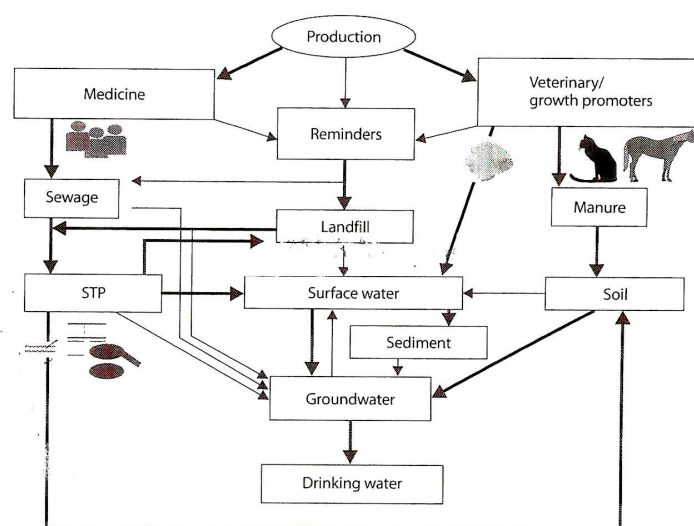
Další možností, jak se léčiva mohou dostat do životního prostředí, je jejich užití pacientem.

Po aplikaci se tyto sloučeniny částečně nebo úplně metabolizují a jsou z těla vylučovány společně s močí či exkrementy. Z domácnosti se pak odpadní vodou dostanou do komunální čistírny odpadních vod, kde dochází k odbourání více nestabilních sloučenin (Brun, 2006). Čistírny ale nedokáží odbourat veškerá léčiva, která se tímto způsobem mohou dostat do povrchové vody, jež je možným zdrojem vody pitné.

Veterinární léčiva se po vyloučení z těla mohou dostat do půdy díky používání zvířecích exkrementů jako hnojiva. Při silném dešti se pak s odtékající vodou z polí dostanou do povrchové vody (Kümmerer, 2001).

Koncentrace léčiv, která se dostanou do povrchové a pitné vody nebo se nachází v usazeninách, dosahují hodnot v rozmezí  $\text{ng l}^{-1}$  do  $\mu\text{g l}^{-1}$  (Ferrari a kol., 2004).

Rezidua léčiv, která se nachází ve vodním prostředí, se obvykle nevyskytují samostatně, nýbrž jako směsi (Cleuvers, 2003). Tudiž sloučenina, která nepůsobí rizikově, může naopak zvýšit toxicitu jiných (Jones a kol., 2007). Vedle této aditivní vlastnosti mohou chemické sloučeniny působit na testované organismy antagonisticky či synergicky (Tsiridis a kol., 2002).



**Obr.1:** Průnik léčiv do životního prostředí (převzato od Kümmerer)



Tím, že se léčiva dostávají do povrchové vody, mohou negativně ovlivnit ekosystém.

Ekosystém je charakterizován ustálenou výměnou hmoty a energie mezi anorganickou a organickou složkou přírody. Je ovlivňován především výměnou vody mezi zemským povrchem a atmosférou a koloběhem asi 20 prvků, z nichž nejvýznamnější jsou uhlík, kyslík, vodík, dusík a fosfor (Papáček a kol., 1994). Rozlišují se ekosystémy suchozemské (louka, les, rašeliniště) a vodní (periodická tůň, řeka, jezero, moře). Hranice suchozemských ekosystémů je tvořena zpravidla geologickým podkladem a typem vegetace (Zicháček, 1995).

Živá složka ekosystému se dělí z hlediska přenosu hmoty a energie na **producenty, konzumenty a destruenty**.

**Producenti** vytváří za pomoci sluneční energie ve svých tělech organickou hmotu z anorganických látek. Tato hmota představuje zdroj energie. Patří zde všechny rostliny schopné fotosyntézy (tedy obsahující chlorofyl).

**Konzumenti** jsou heterotrofní organismy, býložravci a masožravci, jež se živí organickou hmotou jako zdrojem látek a energie.

**Destruenti** uvolňují z odumřelé organické hmoty minerální látky, které využívají konzumenti. Patří zde bakterie, plísně, houby (Papáček a kol., 1994).

## **1.1 Cíl práce**

Tato diplomová práce je zaměřena na zjištění možného ekotoxikologického působení vybraného léčiva. Jedná se o léčivý přípravek IBALGIN® 400 mg s obsaženou účinnou látkou ibuprofen. Hodnotí se několik koncentrací daného vzorku léčiva pomocí testů toxicity. Testy byly vybrány tak, aby se jednak zhodnotila akutní toxicita

ibuprofenu, jednak aby se pracovalo s organismy všech trofických úrovní ekosystému a výsledky se mohly extrapolovat na životní prostředí. Ze zjištěných výsledků je možné určit, zda je léčivo netoxické, toxické či extrémně toxické.

## 2 Teoretická část

V této kapitole je postupně představena ekotoxikologie a testy toxicity, popis vybraného léčiva a jeho zařazení do skupiny podle onemocnění, testované organismy a principy užitých testů.

### 2.1 Ekotoxikologie, ekotoxikologické testy a jejich členění

Ekotoxikologie je vědní disciplína studující nepříznivé účinky chemikálií na životní prostředí a na ekologické systémy. Tyto účinky mohou být jak letální (mortalní) tak subletální (např. ovlivnění růstu a rozmnožování) (Knight, 2003).

Termín ekotoxikologie použil jako první kolem roku 1969 člen francouzské akademie věd Dr. Rene Truhaut. Definoval ekotoxikologii jako „studium nepříznivých účinků chemikálií s cílem chránit přírodní druhy a společenstva“ (Kočí, 2002).

Tento vědní obor se liší od pojetí klasické toxikologie, která je založená na studiu vlivu toxických látek na jednotlivce za experimentálních podmínek. Přitahuje pozornost početných badatelů z různých vědních oborů, jako např. toxikologie, ekologie, chemie, biologie, farmakologie, lékařství (Moiseenko, 2008).

Na počátku 70. let 20. století byly vytvořeny programy sloužící k monitorování životního prostředí, které byly založeny na chemické analýze významných kontaminantů (PCB, těžké kovy, organochloridové pesticidy) v různých médiích (voda, sediment, půda, organismy) (Narbonne, 2000).

Historicky nejrozšířenější oblastí ekotoxikologie je její aquatická část (Kočí, 2002)

Aquatická ekotoxikologie je definována jako vědní disciplína studující vlastnosti a chování škodlivin ve vodním ekosystému a jejich dopad na organismy, populace a společenství (Moiseenko, 2008).

Významnou úlohu v oblasti monitorování životního prostředí představují biotesty. Slouží pro odhad rizik testované látky v životním prostředí.

Biotest lze definovat jako proces, při kterém je testovaný systém (tkáň, organismus, populace apod.) exponován v přesně definovaných podmínkách různými koncentracemi zkoumané chemické látky nebo směsného či přírodního vzorku. Většinou nemůže podat informace o přítomnosti konkrétní látky v konkrétním množství v příslušném vzorku. To je předmětem až chemické analýzy (Kočí, 2002).

Ekotoxikologické testy jsou biologické pokusy s různými druhy za přítomnosti chemických látek nebo vzorků z životního prostředí. Jsou požadovány pro zhodnocení rizika nových a existujících chemikálií a také pro monitorování ekologické kvality (odpady, sediment, půdní vzorky) (Ratte, 2003).

Podstatou testů toxicity je zhodnotit vliv testovaného vzorku na přežití nebo růst testovaného organismu. Výsledky se pak vyjadřují jako  $LC_{50}$  (koncentrace vzorku, která zapříčiní 50% úhyn),  $EC_{50}$  (koncentrace vzorku, která má za následek 50% účinek) nebo  $IC_{50}$  (koncentrace vzorku způsobující 50% inhibici). V kontrolním vzorku musí přežít nejméně 90% testovaných jedinců. Ze zjištěných hodnot se vypočítá toxická jednotka (TU) podle vzorce:

$$TU = [1/EC_{50} (LC_{50})] \times 100 \text{ (Tsiridis a kol., 2002).}$$

Vzorky jsou následně zařazeny do jedné z následujících tříd na základě hodnoty toxické jednotky (TU).

**Tab. 1:** Toxický klasifikační systém (převzato od Persoone a kol., 2003)

TU		Toxický účinek
<0,4	Třída I	netoxický
0,4 < TU < 1	Třída II	mírně toxický
1 < TU < 10	Třída III	toxický
10 < TU < 100	Třída IV	vysoce toxický
TU > 100	Třída V	extrémně toxický

Hlavní nevýhodu užití ekotoxikologického biotestu představuje kontinuální kultivace testovaného organismu (Wadhia, 2007).

Trendem posledních let je vyvíjet takové metodiky ekotoxikologických biotestů, které jsou miniaturizované, plně validovatelné, a umožňují tudíž sledovat nepříznivý vliv látek na živé organismy za standardních podmínek (Kočí, 2002).

Příkladem rozvoje miniaturizovaných ekotoxikologických biotestů jsou toxkity.

Toxkit je obecné označení mikrobiotestů vyvinutých výzkumným týmem profesora G. Persoone v Laboratoři pro výzkum ve vodním znečištění (LABRAP) na univerzitě Ghent v Belgii (Wadhia, 2007).

V kitu (soupravě) se nachází všechen potřebný materiál včetně testovaného organismu k provedení jednoduchého, rychlého, citlivého, levného a opakovatelného testu. Testovaný organismus je v imobilizované podobě, ze které je před vlastním provedením testu toxicity aktivován (Algaltokit, 1996).

Rozdělení ekotoxikologických testů je v evropské monografii značně nejednotné.

Nejčastější dělení:

Dle doby expozice:

- akutní
- semiakutní (semichronické)
- chronické

Dle pokročilosti designu testovaného systému (také 3 generace biotestů):

- 1. generace – klasické (standardní)
- 2. generace – mikrobiotesty
- 3. generace – biosenzory, biofondy a biomarkry

Dle trofické úrovně testovacích organismů:

- producenti
- konzumenti
- destruenti

Dle testované matrice:

- voda
- půda
- vzduch
- sediment
- odpad
- chemická látka

Dle spektra testovacích organismů:

- jednodruhové
- vícepruhové

Dle typu testovaného vzorku:

- čisté chemické látky (hydrofilní, hydrofobní, těkavé)
- směs látek (známých i neznámých)
- přírodní vzorky (většinou neznámé, směsné, s neznámými interakcemi)

Dle způsobu přípravy vzorku:

- definované koncentrace chemických látek
- testování výluhů přírodních vzorků (extrakce organickými rozpouštědly, DMSO, vodou, různé pH, teplota)
- semipermeabilní membrány
- přímé testy (Direct Tests, Solid Phase Tests, Whole Effluent)

Dle stupně komplexnosti detekčního systému:

- enzymy
- biofondy
- buněčné a tkáňové kultury *in vitro*
- intaktní živý organismus
- populace
- micro/mezo kosmos
- terenní experimenty

Dle způsobu vyhodnocování:

- letální efekty (mortalita, imobilizace)
- subletální efekty (chování organismů – např. rychlost a směr pohybu)
- hodnocení fyziologické aktivity (fotosyntetické asimilace, enzymatická aktivita, efekty na membránách, přírůstky – délka kořene, počet buněk v populaci, hmotnost organismu, náchylnost k napadení chorobami, škůdci či paraziti)
- reprodukční aktivita

- malformace
- teratogenita

#### Speciální testy pro hodnocení rizik v životním prostředí

- mutagenita/ genotoxicita na bakteriích, rostlinách, volně žijících zvířatech, rybách
- teratogenita na obojživelnících
- embryotoxicita a reprodukční testy na rybách, korýších, obojživelnících, ptácích (Kočí, 2002)



## **2.2 Legislativa týkající se ekotoxikologie**

V oblasti ochrany životního prostředí má nezastupitelné místo i legislativa. V České republice existuje rozsáhlý soubor platných a připravovaných právních předpisů. Proto je zde uveden výčet těch, se kterými se může ekotoxikolog setkat.

### **Zákon**

- **č. 185/2001 Sb., Zákon o odpadech a o změně některých dalších zákonů**
- **č. 356/2003 Sb., Zákon o chemických látkách a chemických přípravcích a o změně některých zákonů, jak vyplývá ze změn provedených zákonem č. 186/2004 Sb., zákonem č. 125/2005 Sb., zákonem č. 345/2005 Sb. a zákonem č. 222/2006 Sb.**

### **Vyhláška**

- **č. 376/2001 Sb., Vyhláška Ministerstva životního prostředí a Ministerstva zdravotnictví o hodnocení nebezpečných vlastností odpadů**
- **č. 383/2001 Sb., Vyhláška ministerstva životního prostředí o podrobnostech nakládání s odpady**
- **č. 382/2001 Sb., Vyhláška ministerstva životního prostředí o podmínkách použití upravených kalů na zemědělské půdě**
- **č. 389/2005 Sb., Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 222/2004 Sb., kterou se u chemických látek a chemických přípravků stanoví základní metody pro zkoušení fyzikálně – chemických vlastností, výbušných vlastností a vlastností nebezpečných pro životní prostředí**
- **č. 223/2004 Sb., Vyhláška Ministerstva životního prostředí, kterou se stanoví bližší podmínky hodnocení rizika nebezpečných chemických látek pro životní prostředí**

- č. 220/2004 Sb., Vyhláška Ministerstva životního prostředí, kterou se stanoví náležitosti oznamování nebezpečných chemických látek a vedení jejich evidence
- č. 540/2006 Sb., Vyhláška, kterou se mění vyhláška č. 221/2004 Sb., kterou se stanoví seznamy nebezpečných chemických látek a nebezpečných chemických přípravků, jejichž uvádění na trh je zakázáno nebo jejich uvádění na trh, do oběhu nebo používání je omezeno, ve znění pozdějších předpisů <sup>(2)</sup>

### **2.3 Nesteroidní protizánětlivé látky (nesteroidní antiflogistika)**

Mezi nesteroidní protizánětlivé látky patří převážně syntetické sloučeniny kyselé povahy. Ve své molekule obsahují volnou karboxylovou funkční skupinu, případně se jedná o látky enolického charakteru. Výraz nesteroidní zdůrazňuje skutečnost, že tato skupina léčiv nezahrnuje glukokortikoidy, které se liší mechanismem účinku a mohou mít výrazné nežádoucí účinky (Hartl a kol., 1994).

#### **Mechanismus účinku**

Nejdůležitějším efektem nesteroidních antiflogistik je jejich schopnost inhibovat cyklooxygenasu, enzym katalyzující vznik prozánětlivých mediátorů – prostaglandinů (Macek a kol., 2005).

Prostanoidy se účastní řady fyziologických procesů a za patologických situací se významně podílejí na rozvoji bolesti, horečky a zánětu (Lincová a kol., 2007).

V organismu existují dvě izoformy cyklooxygenasy, tzv. COX – 1 a COX – 2.

**COX – 1**, nazývaná též konstituční, je za fyziologických podmínek tvořena buňkami žaludeční sliznice, ledvin a krevních destiček a zodpovídá za syntézu pro tělo potřebných prostaglandinů (Macek a kol., 2005).

---

Pozn.:

enol: přítomnost karbonylové funkce v molekule aldehydu nebo ketonu má za následek zvýšení kyselosti vodíkových atomů vázaných na atomu uhlíku sousedícím s karbonylovou skupinou (tzv.  $\alpha$  – vodík). Pokud molekula  $\alpha$  – vodík ztratí, vznikne aniont, který může přijmout zpět proton. Proton se může připojit jak na „uhlíkový“, tak na „kyslíkový“ konec molekuly a vzniká tzv. oxoforma nebo enolforma původní karbonylové sloučeniny (Svoboda a kol., 2005).

**COX – 2** je syntetizovaná působením prozánětlivých faktorů: cytokinů IL – 1, IL – 2 a TNF –  $\alpha$ , onkogenů, bakteriálních lipopolysacharidů aj. v místě zánětu, proto bývá označována jako inducibilní. Zodpovídá za tvorbu prostanoidů, které mají lokální zánětlivý účinek, podílí se na vzniku horečky a bolesti.

Zjistilo se, že i COX – 2 je konstitučně přítomna v omezeném počtu tkání a může plnit některé fyziologické funkce v centrálním nervovém systému, ledvinách a trávicím ústrojí. Účastní se reprodukčních funkcí (ovulace a implantace vajíček), při remodelaci kostí i hojení žaludečních vředů. Na druhé straně k indukci COX – 1 může docházet za patologických situací, např. ve střevě při radiačním poškození střevní sliznice (Lincová a kol., 2007).

### **Farmakokinetika**

Po perorálním podání se dobře a rychle vstřebávají z gastrointestinálního traktu (Macek a kol., 2005).

Silně se váží na proteiny krevní plazmy ( $\geq 98\%$ ), většinou na albumin. Tato silná vazba může být příčinou klinicky významných lékových interakcí.

Metabolismus většiny těchto látek probíhá částečně pomocí CYP3A nebo CYP2C rodinami jaterních enzymů P450. Renální exkrece je nejdůležitější cestou konečné eliminace, téměř všechny látky podléhají variabilní exkreci žlučí a reabsorpci (enterohepatální cirkulace) (Katzung, 2006).

Dobře prostupují hematoencefalickou bariérou do mozku a většinou i placentární bariérou, hrozí tedy nežádoucí účinky na plod. Prostup do mateřského mléka je u jednotlivých látek variabilní a podání kojící matce musí být u každé látky zváženo individuálně.

Většina látek má krátký poločas eliminace a musí se proto podávat 3 – 4krát denně (Lincová a kol., 2007).

## 2.4 Ibuprofen

Jedná se o jedno z nejvíce používaných léčiv na světě (Moore, 2003).

### **Terapeutické indikace**

Ibuprofen je indikován k systematické léčbě zánětlivých a degenerativních chorob kloubních, mimokloubního revmatismu a chorob páteře, používá se při psoriatické artritidě, dnavé artritidě, při distorzi kloubů a zhmoždění pohybového aparátu. Jako analgetikum – antipyretikum se využívá při horečnatých stavech a zánětlivých onemocněních horních cest dýchacích, dále při migréně, bolestech po operaci, bolestech zubů a bolestivé menstruaci.

### **Nežádoucí účinky:**

Velmi časté: nauzea, zvracení, pálení žáhy, průjem, obstipace, nadýmání

Časté: bolesti v epigastriu

---

Pozn.:

psoritický: týkající se psoriázy (lupénky)

psoriáza: chronické kožní onemocnění s poruchou keratinizace povrchových vrstev kůže; projevuje se výsevem drobných červených pupínků, které později splývají ve větší ložiska pokrytá stříbrnými šupinkami

dna: metabolické kloubní onemocnění způsobené poruchou metabolismu a vylučování kyseliny močové vznikající převážně jako konečný produkt odbourávání nukleových kyselin a nukleotidů; močová kyselina se ukládá v podobě malých krystalků do kloubů i dalších vnitřních orgánů (ledviny) a poškozuje je

artritida: zánět kloubů

distorze kloubu: podvrtnutí kloubu (Vokurka a kol., 2006)

Vzácné: gastritida, žaludeční vřed, duodenální vřed, krvácení, případně perforace gastrointestinálního traktu

Velmi vzácné: exacerbace ulcerózní kolitidy (MV AISLP, 2009.1).

Nefrotoxicita byla sledována jen při předávkování (Moore, 2003).

Za účelem snížení lokálního žaludečního podráždění byla vytvořena řada derivátů N,N – disubstituovaného aminoalkohol esteru ibuprofenu. Zjistilo se, že tyto estery zlepšují terapeutický profil, jsou snadno hydrolyzované v plazmě, ponechávají si antiflogistické působení a především snižují žaludeční podráždění vyvolané mateřským léčivem (Halen a kol., 2007).

### **Interakce**

Současné podání ibuprofenu s warfarinem, může vést ke zvýšenému riziku krvácení. Fenobarbital zrychluje metabolizaci ibuprofenu. Naopak ibuprofen zvyšuje plazmatické hladiny lithia, dioxinu a fenytoinu, snižuje účinek diuretik a antihypertenziv.

Tím, že ibuprofen zasahuje do syntézy prostaglandinů v ledvinách, mohlo by jeho společné podání s cyklosporinem vést ke zvýšení nefrotoxicity.

---

Pozn.:

nauzea: nevolnost, pocit na zvracení

epigastrium: nadbříšek. Horní část břicha zhruba v úhlu mezi žeberními oblouky

gastritida: zánět žaludku

perforace gastrointestinálního traktu: proděravění, protržení trávicího traktu

ulcerózní kolitida: zánět tlustého střeva

exacerbace: nové vzplanutí chronické nemoci, která není dostatečně zhojena nebo jejíž příčina trvá (Vokurka a kol., 2006)

## **Kontraindikace**

Ibuprofen nesmí být používán při známé přecitlivělosti na léčivou látku, při přecitlivělosti na kyselinu acetylsalicylovou nebo jiná nesteroidní antiflogistika projevující se jako astma a jiné alergické reakce, při gastrointestinálním krvácení a peptickém vředu v anamnéze.

Třetí trimestr těhotenství vylučuje též používání tohoto léčiva.

## **Těhotenství a kojení**

Vývoj embrya a plodu může být nepříznivě ovlivněn inhibicí syntézy prostaglandinů. Pokud je to nezbytné, lze ibuprofen užít v průběhu prvního a druhého trimestru gravidity v nízkých dávkách a terapie by měla být co nejkratší.

Ve třetím trimestru těhotenství může podání ibuprofenu vyvolat kardiovaskulární toxicitu a renální dysfunkci, která může skončit poškozením ledvin (MV AISLP, 2009.1).

## 2.5 Testované organismy

### 2.5.1 Selenastrum capricornutum

#### **Taxonomické zařazení**

Říše: **Plantae**

Podříše: **Viridiplantae**

Oddělení: **Chlorophyta**

Třída: **Chlorophyceae**

Řád: **Chlorococcales**

Čeleď: **Scenedesmaceae**

Rod: **Selenastrum**

Druh: ***Selenastrum capricornutum*** (Kalina, 2005)

#### **Oddělení: Chlorophyta**

Patří zde volně žijící bičíkovci a jednobuněčné, kapsální, trichální, heterotrichální, sifonokladální nebo sifonální řasy.

V přírodě hrají významnou úlohu primárních producentů organické hmoty. Na jejich přítomnosti jsou závislí sekundární producenti, konzumenti a destruenti organické hmoty (Kalina, 2005).

Shodně s vyššími rostlinami vykazují škrob jako zásobní látku, jehož zrna se nachází v chloroplastech nebo na povrchu pyrenoidu (oválné nebo kulovité bílkovinné tělísko obsahující enzymy). Buněčná stěna je vícevrstevná složená z celulóznych mikrofibril (Leifertová, 1990).

Charakteristickým prvkem je přítomnost chlorofylu **b** (Pouličková, 2001).



Mitóza je zpravidla uzavřená. Znamená to, že jaderný obal zůstává během jaderného dělení zachovaný.

V životním cyklu převládá nepohlavní rozmnožování. Pohlavní proces není závazný, může být izo – nebo anizogamní, u některých skupin i oogamní.

### Třída: **Chlorophyceae**

Jedná se o druhově bohatou třídu obsahující volně žijící bičíkovce, jednobuňčné kapsální a kokální řasy (Kalina, 2005).

V buněčné stěně mnohých zástupců této třídy se vyskytuje sporoplenin – velmi odolná látka, díky níž jsou řasy chráněny před UV zářením a před mechanickým a chemickým poškozením (Pouličková, 2001).

---

Pozn.:

bičíkovec (**stélka monadoidní**) – jednobuňčná stélka nejčastěji kapkovitého tvaru se zúženým předním (apikálním) koncem s bičíky a zaobleným zadním koncem

buňka ve slizu (**kapsální stélka**) – jednobuňčná stélka obklopená slizem

vlákno (**trichální stélka**) – buňky se spojují do vlákna, které může být jednoduché nebo větvené; složitější větvení, kdy lze sledovat silnější osní vlákno a tenčí postranní vlákna, se označuje jako heterotrichální stélka

**pletivná stélka** – je odvozena od heterotrichální

**sifonokladální** – vláknitá, složená z mnohjaderných buněk

trubicová (**sifonální stélka**) – tvořena jednou velkou mnohjadernou buňkou

izogamie – gamety mají stejný tvar i velikost, jsou opatřeny bičíky

anizogamie – gamety mají bičíky, liší se ale velikostí; menší gamety se považují za samčí.

oogamie – samičí gameta je větší, bez bičíku, samčí gameta je menší, opatřená bičíkem (Pouličková, 2001).

Zelenivky žijí buď jednotlivě, nebo v koloniích (Leifertová, 1990).  
Rozmnožování probíhá nepohlavně i pohlavně (Pouličková, 2001).

Řád: **Chlorococcales**

Jedná se o heterogenní skupinu převážně sladkovodních řas, která obsahuje značný počet rodů (Kalina, 2005).

Druh: ***Selenastum capricornutum***

Jedná se o jednobuněčnou zelenou řasu (Brun a kol., 2005). Vyznačuje se půlměsícovým tvarem ( $40 - 60 \mu\text{m}^3$ ), dost rychlým růstem, je běžná ve většině čerstvých vod (3). Toxický materiál zasahuje do růstu řasy. Tento zásah se dá měřit jako pokles počtu žijících řasových buněk (Brun a kol., 2006).



**Obr.2:** *Selenastrum capricornutum*, (4)

## 2.5.2 *Thamnocephalus platyurus*

### **Taxonomické zařazení**

Říše: **Animalia**

Kmen: **Arthropoda**

Podkmen: **Crustacea**

Třída: **Branchiopoda**

Řád: **Anostraca**

Rod: **Thamnocephalus**

Druh: ***Thamnocephalus platyurus*** (Sedlák, 2000)

Podkmen: **Crustacea**

Jsou to převážně vodní členovci, málo druhů je suchozemských, ale i ty preferují vysokou vzdušnou vlhkost (Sedlák, 2000).

U většiny korýšů srůstá hlava s několika články hrudi v hlavohruď. Za ní následují volné články hrudi a zadeček (Papáček a kol., 1994). Povrch těla je kryt krunýřem, jenž je většinou prostoupen vápenatými solemi (Zicháček, 1995).

Končetiny mohou být buď jednovětvené - slouží k lezení, nebo jsou rozeklané, dvouvětvené – slouží k plavání, dýchání (Sedlák, 2000).

První dva páry hlavových končetin jsou přeměněny v tykadla (antenuly a antény), další tři páry pak v kousací ústrojí – jeden pár kusadel (mandibuly) a dva páry čelistí (maxily) (Zicháček, 1995).

Hruď se složena z různého počtu článků, končetiny na prvních třech člancích jsou přeměněny v čelistní nožky, ostatní hrudní končetiny slouží k pohybu. Na posledním tělním článku (telsonu) bývá řitní otvor a může se zde nacházet furka (dva výběžky tvořící vidličku).

Trávící soustava je trubicová. Do střeva ústí vývody jaterní žlázy (Sedlák, 2000).

K dýchání slouží žábra mající podobu hřebínkovitých výrůstků umístěných na končetinách. Někteří korýši dýchají celým povrchem těla (Papáček a kol., 1994).

Cévní soustava je otevřená s dominující dorzální cévou. U nižších druhů je často vytvořena jen hřbetní céva se sérií ostií, u některých došlo k její redukci na pouhé srdce (u perlooček), nebo cévní soustava úplně vymizela (u klanonožců).

Jako smyslové orgány využívají chemoreceptory a mechanoreceptory vyskytující se zejména na tykadlech.

Vývoj jedinců může být přímý nebo přes larvální stádium. Základními typy larev jsou nauplius a zoea (Sedlák, 2000).

Tělo nauplia není článkované, disponuje jediným okem a třemi páry přívěsků, ze kterých se v průběhu vývoje vytváří oba páry tykadel a kusadla. Další články s končetinami dorůstají postupně (Papáček a kol., 1994).

Zoea má naopak pár složených očí, všechny hlavové končetiny, některé hrudní končetiny, štíhlý článkovaný zadeček a širokou hlavohruď nesoucí výrůstky a trny.

### Třída: **Branchiopoda**

Jedná se o drobné korýše, žijících většinou ve sladké vodě. Nemají vytvořeny čelistní nožky. Zadeček je bez končetin. Mnoho druhů žije pouze v periodicky stojatých vodách bez ryb či jiných predátorů, často to jsou jarní či letní tůně. Všechny druhy jsou ohroženy eutrofizací vody a melioračními úpravami, které vedou téměř vždy k zániku jejich biotopů (Sedlák, 2000).

## Řád: **Anostraca**

Tělo těchto živočichů je protáhlé, ze stran zploštělé, dosahující délky do 30 mm (Zicháček, 1995).

Na hlavě se nachází složené oči na stopkách, mezi nimi je jednoduché naupliové očko (jednoduché a pohárkové oko). Hrudní nožky jsou lupenité, nesou žábry a slouží též k plavání, dýchání a k filtraci potravy.

Plavou v typické poloze otočené hřbetem dolů, výjimečně se při víření a filtraci sedimentu přetácejí.

Samečci disponují zvětšenými, hákovitými druhově specifickými anténami, které slouží k přichycení na samičku při kopulaci (Sedlák, 2000).

Žábronožky představují obyvatele periodických tůní, jejichž vajíčka jsou značně odolná a životaschopná (Zicháček, 1995).

## Rod: **Thamnocephalus**

---

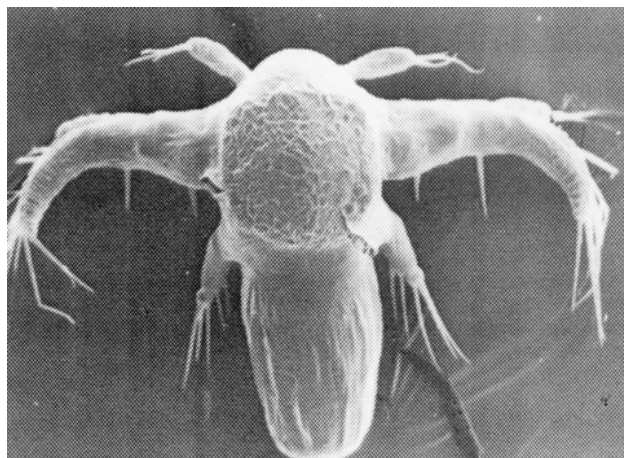
Pozn.:

eutrofizace: postupné obohacování vody a půdy organickými živinami (obvykle dusičnany a fosfáty), tudíž tyto ekosystémy přestávají být omezovány nedostatkem těchto živin, což má za následek růst primární produkce zelené hmoty, tj. rostlin. Rychlá, člověkem navozená eutrofizace, vyúsťuje ve vodním prostředí v bouřlivý rozvoj řas, jejichž biomasa je po odumření rozkládána bakteriemi za současné spotřeby kyslíku. To může vést k drastickému snížení koncentrace rozpuštěného kyslíku a k ochuzení života ve vodě (Novotná, 2001)

Druh: ***Thamnocephalus platyurus***

Tato žábřonožka žije v drobných vodách středních a jihozápadních států USA a Mexika. Dospělý jedinec dosahuje délky až 5 cm, jeho nauplia mají však mikroskopické rozměry (Sládeček, 1997).

Vajíčka tohoto koryše jsou chráněna tlustou skořápkou, aby dokázala přežít i dlouhou dobu vysoušení. Tato adaptace se označuje jako kryptobióza (Radhika a kol., 1993).



**Obr.3:** *Thamnocephalus platyurus* – nauplius, čerstvě vylíhlá larva (5)

### 2.5.3 Tetrahymena pyriformis

#### **Taxonomické zařazení**

Říše: **Protozoa**

Kmen: **Ciliophora**

Třída: **Oligohymenophorea**

Řád: **Hymenostomatida**

Rod: **Tetrahymena**

Druh: ***Tetrahymena pyriformis*** (Sedlák, 2000)

#### **Kmen: Ciliophora**

Zástupci tohoto kmene se řadí k nejdokonalejším prvokům vyznačující se nejsložitější stavbou těla (Zicháček, 1995).

Buňku pokrývají specifické pohybové organely – brvy (cilie), které se mohou modifikovat v lupínkovité membranelly potřebné i k přihánění potravy. Nálevníci disponují poměrně komplikovanou stavbou buněčného pokryvu vytvářející kortex. Kortex obsahuje alveoly – váčky uzavřené v buněčné membráně, naplněné roztoky bílkovin a polysacharidů (Sedlák, 2000).

V buněčné membráně jsou zakomponovány trichocysty. Jedná se o váčkovité organely, jejichž obsah má charakter buněčných jedů. Při mechanickém nebo chemickém podráždění vystřelují svůj obsah, jenž ve vodě tuhne v rosolovité vlákno (Papáček a kol., 1994).

Změnu tvaru buňky zajišťuje systém mikrotubulů a kinetodesmálních fibril označovaných infraciliatura. Mikrotubuly jsou seřazeny do podélných, okružních i šikmých svazků. Fibrily se napojují na báze brv.

Vedle těchto organel se v buňce nachází potravní orgány. Jsou tvořeny buněčnými ústy (cytosom), v jejichž okolí se nachází řada brv sloužící k přihánění potravy. Na buněčná ústa navazuje trychtýřovitý buněčný hltan (cytopharynx), na jehož konci se odškrucují potravní vakuoly, na které se napojují váčky s trávícími fermenty vznikající v lysosomech buňky. Nestrávené zbytky odchází z místa označovaném jako buněčná řiť (cytophyge) (Sedlák, 2000).

Nálevníci disponují dvěma typy jader. Velké jádro vegetativní (makronukleus) řídí veškeré životní funkce s výjimkou rozmnožování. Malé jádro generativní (mikronukleus) hraje důležitou roli v procesu rozmnožování (Papáček a kol., 1994). Obě jádra jsou obklopena jaderným obalem (Elliott a kol., 1962).

Množení probíhá ve dvou formách: nepohlavní se uskutečňuje příčným dělením, pohlavní probíhá zvláštním způsobem zvaným konjugace (Papáček a kol., 1994).

Při konjugaci (spájení) dochází k rozpadu makronuklea a několikanásobnému rozdělení mikronuklea, tímto způsobem si jedinci předávají genetickou informaci. Následuje oddělení konjugovaných buněk přecházející v mitotické dělení obou jedinců a vše je zakončeno další konjugací (Sedlák, 2000).

---

Pozn.:

mikrotubuly: trubičky s vnějším průměrem 25 nm a tloušťkou stěny asi 5 nm. Základní bílkovinu představuje tubulin

lysosomy: jednoduché membránové kompartmenty, jejich obecnou funkcí jsou katabolické biochemické procesy (Nečas a kol., 2000)



Třída: **Oligohymenophorea**

Pro tuto třídu je charakteristická odlišnost mezi brvy u cytostomu a brvami sloužícími k pohybu. Membranelly jsou jen málo vytvořeny, případně chybí úplně (Sedlák, 2000).

Řád: **Hymenostomatida**

Rod: **Tetrahymena**

Druh: ***Tetrahymena pyriformis***

Již přes čtyřicet let je tento nálevník vybírán pro hodnocení rozmanitých testů (Nilsson, 1989). Využívá se pro hodnocení toxického působení chemikálií na buňku a také škodlivin na životní prostředí (Sauvant a kol., 1995a). Hraje důležitou roli jako inovační a užitečný prostředek pro monitorování biologického čištění odpadní vody (Nicolau, 2001).

Jde poměrně často používaný model při výzkumu v laboratoři. Vyznačuje se krátkým životním cyklem, kultivace probíhá snadno za laboratorních podmínek a toxické působení substancí může být testováno na několika generacích (Sauvant, 1999).

*Tetrahymena* má hruškovitý tvar, dosahuje délky 40 – 60  $\mu\text{m}$ , buněčná ústa jsou vybavena membránou a membranellami (Nilsson, 1989). V přírodním prostředí se živí organickou hmotou (Zilberg, 2006).



**Obr.4:** *Tetrahymena pyriformis* (6)

## 2.6 Použité testy

Tato část se věnuje principům jednotlivých použitých testů.

### 2.6.1 ALGALTOXKIT F

Tento 72 hodinový test inhibice růstu používá zelenou mikrořasu *Selenastrum capricornutum*, která je deimobilizovaná z řasových kuliček, pro zhodnocení inhibice růstu této řasy (Latif a kol., 2004).

Každý kit je vybaven materiálem k vykonání dvou kompletních zkoušek inhibice růstu řas.

Algaltokit využívá mikrořasy imobilizované ve speciální matrix, v níž přežijí i několik měsíců bez ztráty životaschopnosti. Po deimobilizaci a přenosu do adekvátního řasového kultivačního média, pokračují řasy ve svém růstu. Rychlost dělení zůstává podobná jako u nepřetržité kultivace dané řasy.

Zkouška musí být započata nejpozději 30 minut po deimobilizaci řas z kuliček (Algaltokit, 1996).

Vyhodnocení lze uskutečnit pomocí spektrofotometru, případně počítáním buněk řas díky Bürknerově komůrce.

### 2.6.2 THAMNOTOXKIT F

24 hodinový test pro určení akutní toxicity využívá larvální stádium členovce *Thamnocephalus platyurus* vylíhnutého z cyst. Každý test obsahuje materiál k provedení kompletních 6 testů toxicity, případně pro stanovení 5 testů a jednoho kontrolního testu se standardním toxinem dichromanem draselným (Thamnotokit, 1995).

Zhodnocení akutní toxicity se provádí ve třech paralelních stanoveních s 10 larvami v 1 ml dané koncentrace léčiva. Mortalita se zaznamenává po 24 hodinovém působení toxinu na larvy. Test se považuje za platný, pokud mortalita v kontrolních jamkách nepřesáhne 10% (Törökne, 2006).

### 2.6.3 RAPIDTOXKIT

Tento test byl vytvořen teprve před nedávnem. Pro stanovení toxicity se využívá larev korýše *Thamnocephalus platyurus*. Jedná se v podstatě o krátkou verzi 24 hodinového mikrobiotestu THAMNOTOXKIT F.

Testovaný organismus je na krátkou dobu (15 min – 1 hod) vystaven působení příslušného vzorku, po kterém následuje přidání červených mikrosfér. Larvy v kontrolách (standardní voda) přijímají mikrosféry, což má za následek zbarvení trávicího traktu. U stresovaných (intoxikovaných) larev rychlost příjmu potravy klesá, v případě velmi silného stresu se dokonce zastaví.

Tento test je zvláště vhodný pro zjištění kontaminace vody, která může pramenit z náhodného nebo úmyslného znečištění cizorodou látkou (Rapidtoxkit, 1995).

### 2.6.4 PROTOXKIT F

24 hodinový test inhibice růstu využívá nálevníka *Tetrahymena pyriformis* (Protoxkit, 1998).

Zkouška je založená na přeměně substrátu nálevníkem v biomasu (Nalecz – Jaweckí a kol., 2003).

Protoxkit je vícegenerační test, kdy v průběhu 24 hodin vznikne 5 – 6 generací (Protoxkit, 1998).

Každé stanovení se zkouší minimálně ve třech opakováních. Pro přípravu ředící řady vzorku se použije destilovaná voda (Nalecz – Jawecki a kol., 2003).

Vyhodnocení se v originálním uspořádání provádí na spektrofotometru. V laboratoři se tento test může provést na mikrotitračních destičkách s vyhodnocení na readeru (Protoxkit, 1998).

#### 2.6.5 MTT test

Jedná se o kolorimetrickou zkoušku využívající redukce MTT (3 - [4, 5 – dimethyl thiazol - 2 - yl] – 2, 5 – diphenyl – tetrazolium bromide). Tento test je aplikován na hodnocení životaschopnosti nálevníka *Tetrahymena pyriformis* (Dias, 1999).

Princip této metody spočívá v přeměna tetrazolové soli (MTT) mitochondriální dehydrogenasou životaschopných buněk ve formazan (Edmondson, 1988).

Metabolická redukce nemusí probíhat jen v mitochondriích, poněvadž další možnosti představují lysosomy (Liu, 1997).

Krystaly formazanu mohou být buď pozorovány v buněčné cytoplasmě testovaného organismu pomocí mikroskopu, nebo rozpuštěny organickým rozpouštědlem např. DMSO, a vyhodnocení se získá spektrofotometricky.

Zatímco tetrazolová sůl představuje skupinu ve vodě rozpustných kvarterních amoniových solí, krystaly formazanu jsou naopak ve vodě nerozpustné a intenzivně zbarvené (Dias, 1999).

V původním pojetí byl tento test vyvinut pro práci se savčími buňkami. Později byl ale pozměněn i pro užití s nálevníkem *Tetrahymena sp* (Mosmann, 1983).

MTT test se široce používá pro zjištění toxického působení na buňku a také pro zhodnocení účinku protirakovinných léčiv na nádorové buňky (Vellonen, 2004). Další možné uplatnění tohoto testu představuje hodnocení toxického účinku léčiv na životní prostředí s využitím nálevníka *Tetrahymena pyriformis* (Dias, 1998).

---

Pozn.:

mitochondrie: membránovitá organela, jejíž základní funkcí je syntéza ATP – zdroj energie (Nečas, 2000)

DMSO: dimethylsulfoxid, obvykle se používá jako rozpouštědlo ve vodě nerozpustných substancí používaných na biologický materiál (Nillson, 1974)

### 3 Metodika

#### 3.1 Pomůcky

##### Chemikálie

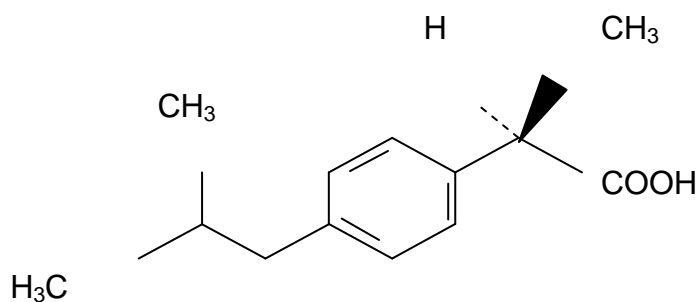
Léčivo (IBALGIN® 400, Ibuprofenum, ZENTIVA)

hmotnost tablety: 0,6246 g

léková forma: potahovaná tableta

popis přípravku: světle fialově červené potahované tablety  
o průměru 12,2 mm (MV AISLP, 2009.1)

Standard léčiva: ibuprofen, (SIGMA, čistota 98 GC)



kyselina (2RS) – 2 – (4 – isobutylfenyl) propionová

Mr: 206,28

vzhled: bílý, krystalický prášek nebo bezbarvé krystaly

rozpustnost: prakticky nerozpustný ve vodě; snadno rozpustný  
v acetonu, methanolu a dichromanu; rozpustný  
ve zředěných roztocích alkalických hydroxidů a  
uhličitanů (Lékopis,2002)

MTT ((3 - [4, 5 – dimethyl thiazol - 2 - yl] – 2, 5 – diphenyl – tetrazolium bromide)) v koncentraci 10 mg/ml

DMSO (dimethylsulfoxid)

Koncentrované roztoky solí: NaHCO<sub>3</sub>, CaSO<sub>4</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KCl

Výživné roztoky A, B, C, D

PPY – médium obsahující pepton a kvasnicový extrakt

Destilovaná voda

Zásobní lahvička s mikrosférami

Fixační roztok

### **Pomůcky**

ALGALTOXKIT F

PROTOXKIT F

RAPIDTOXKIT

THAMNOTOXKIT F

Kádinky

Odměrné baňky

Zkumavky

Stojan na zkumavky

Váženky

Lžička

Petriho misky

Mikropipety

Mikrotitrační destičky

Plastová destička pro THAMNOTOXKIT F

Plastová destička pro RAPIDTOXKIT

Bürknerova komůrka



## **Přístroje**

Předvážky KERN 440 – 47N

Analytické digitální váhy KERN ABJ

Inkubátor AQUALYTIC

Ultrazvuková lázeň SONOREX DIGITAL 10P

Autoklav (Small – Batch Sterilizer) Type KL and TKL - MCS

Třepačka VORTEX – GENIE 2

Box s laminárním prouděním AURA 2000 M. A. C

Reader ANTHOS 2010, software verze 2.3

Počítač ANTHOS 2010, verze 1.7

Světelný mikroskop LEICA

Stereomikroskop LEICA EZ4D

## **Testované organismy**

Cysty korýše *Thamnocephalus platyurus*

Nálevník *Tetrahymena pyriformis*

Imobilizovaná řasa *Selenastrum capricornutum*

### **3.2 ALGALTOXKIT F**

#### **3.2.1 Příprava ředicí řady vzorku**

Testované léčivo i standard se naředí na požadovanou koncentraci v hodnotách mmol/l, z níž se pŕlkovým ředěním připraví požadovaný počet koncentrací. Všechny vzorky jsou připraveny do 4 ml kultivačního média. Standard léčiva byl rozpuštěn za použití 2 % roztoku DMSO.

#### **3.2.2 Příprava kultivačního média pro řasy**

výživný roztok A	10 ml
výživný roztok B	1 ml
výživný roztok C	1 ml
výživný roztok D	1 ml
destilovaná voda	do objemu 1000 ml

Do kalibrované litrové láhve se nalije 800 ml destilované vody, k níž se přidají výživné roztoky A, B, C, D. Nádoba se doplní destilovanou vodou po rysku do objemu 1 000 ml, uzavře zátkou a řádně promíchá k docílení homogenizace média.

Podle potřeby se upraví pH na hodnotu  $8 \pm 0,2$  použitím 1 M HCl nebo NaOH.

### 3.2.3 Příprava řas

#### **Deimobilizace řas**

Z centrifugační zkumavky obsahující řasové kuličky se opatrně vylije tekutina a přidá se do ní 5 ml „médium rozpouštějící matrix“ (Matrix dissolving medium). Zkumavka se uzavře a řádně protřepává každé 2 min až dojde k úplnému rozpuštění matrix imobilizující řasy. Zkumavka se následně centrifuguje 10 minut při otáčkách 3000 rpm. Supernatant se slije a přidá se 10 ml destilované vody, zkumavka se uzavře, protřepe a opět centrifuguje 10 minut při otáčkách 3000 rpm a supernatant se opět slije. Nakonec se přidá 10 ml kultivačního média, zkumavka se uzavře a protřepe.

#### **Příprava koncentrovaného řasového inokula**

Řasová suspenze se z centrifugační zkumavky přeleje do 25 ml kalibrované baňky a k obsahu se přileje řasové kultivační médium po rysku na objem 25 ml. Baňka se uzavře a protřepe, aby se řasová suspenze homogenizovala.

### 3.2.4 Přidání řasového inokula

Do všech zkumavek se vzorkem i standardem léčiva a do zkumavky sloužící jako kontrola se přidá 1 ml řasového inokula v koncentraci  $1 \times 10^4$  řas/1 ml.

### 3.2.5 Inkubace testovaných zkumavek

Zkumavky se inkubují 72 hodin při 21 - 25°C a konstantním osvětlení 10 000 lux.

### 3.2.6 Vyhodnocení

Po 24, 48 a 72 hodinách se pomocí Bürknerovy komůrky získají 3 hodnoty, které se zprůměrnují a získaná hodnota se vynásobí 5 000, tím se získá počet buněk v 1 ml řasové suspenze. Následně se vypočítá průměrné % inhibice růstu řas pomocí vzorce:

$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

A...počet řas v 1 ml – kontrola

B...počet řas v 1 ml – vzorek léčiva

### **3.3 THAMNOTOXKIT F**

Podrobný popis celé metodiky je uveden v protokolu THAMNOTOXKIT F.

#### **3.3.1 Příprava ředící řady vzorku**

Testované léčivo i standard se naředí na požadovanou koncentraci v hodnotách mmol/l, z níž se půlkovým ředěním podle vlastního uvážení připraví požadovaný počet koncentrací. Standard léčiva byl rozpuštěn za použití 2 % roztoku DMSO.

#### **3.3.2 Příprava standardní vody**

NaHCO <sub>3</sub>	1 lahvička
CaSO <sub>4</sub>	2 lahvičky
MgSO <sub>4</sub>	1 lahvička
KCl	1 lahvička
destilovaná voda	do objemu 1 000 ml

Do litrové odměrné baňky se nalije 800 ml destilované vody, do které se postupně přidávají koncentrované roztoky solí. Odměrná baňka se doplní destilovanou vodou na objem 1 000 ml po rysku a řádně se protřepe pro homogenizaci média.

Standardní voda se musí provzdušňovat nejméně 15 min před použitím k líhnutí cyst a před přípravou ředící řady léčiva.

### 3.3.3 Líhnutí cyst

Líhnutí cyst *Thamnocephalus* se může zahájit 24 hod pře začátkem samotného testu.

#### **Příprava líhnoucího média**

Líhnoucí médium je připraveno ze standardní vody a destilované vody v poměru 1 : 8. Zředění standardní vody zmenší osmotický tlak, což vede k vyšší úspěšnosti při líhnutí cyst.

#### **Smáčení cyst**

Do zkumavky s cystami se nalije 1 ml líhnoucího média, mírně se jí promíchává přibližně 30 min.

#### **Přenos na Petriho misku**

Do Petriho misky se nalije 10 ml líhnoucího média a přidají se smáčené cysty. Miska se uzavře víkem, krouživým pohybem se promíchá a inkubuje se alespoň 20 – 22 hod v inkubátoru při kontinuálním osvětlení.

### 3.3.4 Plnění testované destičky

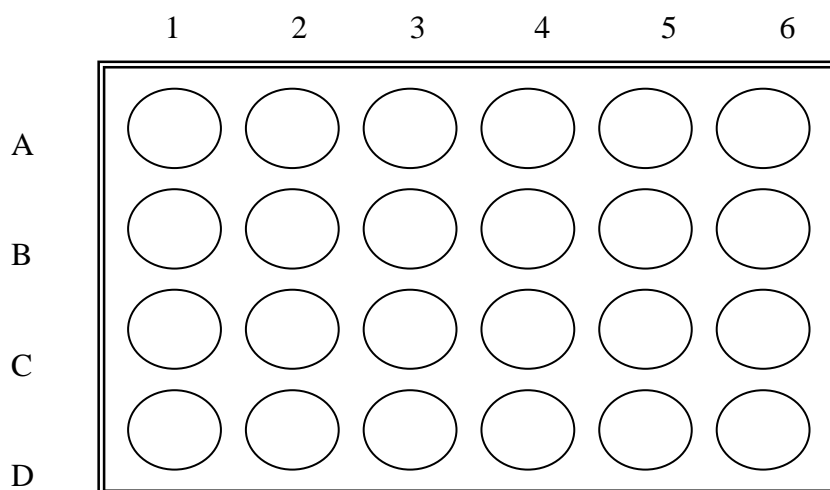
Do každé jamky v řadě B tzv. „ředicí jamky“ se vloží 1 ml standardní vody a pomocí mikropipety přenesou 30 vylíhnutých larev *Thamnocephalus platyurus* z Petriho misky.

Řada A slouží jako kontrola.

Řady C a D se naplní 1 ml sestupně připravené koncentrace léčiva. To znamená, že v jamce C1 a D1 je nejvyšší koncentrace, v jamkách C5 a D5 naopak koncentrace nejnižší. Do každé jamky řad C a D se mikropipetou přenese 10 larev *Thamnocephalus platyurus* z „ředicích jamek“.

Vzhled testovací destičky se může mírně lišit v počtu koncentrací daného léčiva.

Po naplnění všech jamek se destička překryje Parafilmem, zavře víčkem a inkubuje se při 25°C ve tmě.



**Obr.5:**Destička pro THAMNOTOXKIT F

### 3.3.5 Vyhodnocení

Po 24 hodinách se destička vyjme z inkubátoru, vloží se pod stereomikroskop a spočítají se uhynulé larvy v každé jamce.

Pro každou koncentraci léčiva se ze zjištěných počtů uhynulých larev vypočítá % mortality a standardní metodou vyhodnotí 24hLC<sub>50</sub>.

### **3.4 RAPIDTOXKIT**

Podrobný popis celého průběhu provedení testu se nachází v protokolu RAPIDTOXKIT.

#### **3.4.1 Příprava ředící řady vzorku**

Testované léčivo i standard se naředí na požadovanou koncentraci v hodnotách mmol/l, z níž se půlkovým ředěním připraví řada 7 koncentrací. Standard léčiva byl rozpuštěn pomocí 2 % roztoku DMSO.

#### **3.4.2 Líhnutí cyst**

##### **Smáčení cyst**

Do zkumavky s cystami se přidá 1 ml standardní vody. Zkumavka se uzavře a mírně promíchá. Cysty se ponechají hodinu smáčet.

##### **Přenos na Petriho misku**

Smáčené cysty se ze zkumavky přenesou na Petriho misku, zkumavka se vypláchne 1 ml standardní vody, která se přidá k cystám a do misky se přilije ještě asi 8 ml standardní vody. Miska se uzavře víkem, mírně se krouživým pohybem promíchá, aby cysty nezůstaly ulpělé na stěnách a vloží se do inkubátoru na 30 – 45 hodin při teplotě 25°C a kontinuálním osvětlení 3000 – 4000 lux.

Podle výsledků, které prováděl Murugan, je zřejmé, že líhnutí cyst je silně závislé na abiotickém faktoru, světle (Murugan, 1995)



### 3.4.3 Průběh vlastního provedení testu

#### **Plnění zkumavek vzorky**

5 ml každé připravené koncentrace vzorku i standardu léčiva se přenese do zkumavek s modrým víčkem, které je součástí kitu. Do zkumavek sloužících jako kontroly se vlije 5 ml standardní vody.

Vylíhnuté larvy *Thamnocephalus platyurus* se přelijí do zkumavky s červeným víčkem. Pomocí mikropipety se po mírném protřepání postupně odebírá 0,5 ml suspenze, která se přidá do každé z testovaných zkumavek včetně kontrol.

Všechny zkumavky se uzavřou zátkami a vloží se do inkubátoru.

#### **Vložení mikrosfér**

Po hodinové inkubaci při 25°C se do každé zkumavky přidá 200 µl suspenze červených mikrosfér. Zkumavky se zazátkují, mírně protřepou a opět vloží do inkubátoru, tentokrát jen na 15 minut. (Nalecz – Jawecki, 2006)

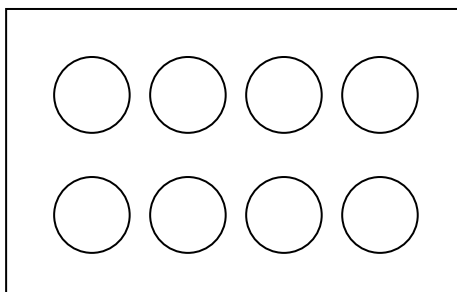
#### **Fixace testovaného organismu**

Po skončení inkubace se larvy usmrtí přidáním tří kapek fixačního roztoku, který je součástí kitu.

### 3.4.4 Vyhodnocení

Uhynulé larvy jednotlivých koncentrací vzorku a standardu léčiva jsou postupně přeneseny na plastovou destičku s 8 jamkami a následně se pomocí stereomikroskopu hodnotí přítomnost či absence červených částíček v trávicím traktu testovaného organismu.

Larvy v kontrolách mají zažívací trakt zbarven červeně, zatímco intoxikované larvy nepřijímají mikrosféry a trávící trakt zůstane neobarvený (Törökne, 2006)



**Obr. 6:** Destička pro RAPIDTOXKIT

Následně se vypočítá průměrné % inhibice příjmu mikrosfér pomocí vzorce:

$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

A...průměrné % příjmu mikrosfér v kontrole

B...průměrné % příjmu mikrosfér v testovaném vzorku

### **3.5 PROTOXKIT F**

Podrobný popis celé metodiky je uveden v protokolu PROTOXKIT F.

#### **3.5.1 Příprava ředicí řady vzorku**

Vzorek léčiva i standardu se rozpustí v destilované vodě na požadovanou koncentraci v hodnotách mmol/l a následným půlkovým ředěním se připraví 5 koncentrací. Standard léčiva je rozpuštěn pomocí 2 % roztoku DMSO.

#### **3.5.2 Příprava PPY média**

pepton	15 g
kvasnicový extrakt	2 g
destilovaná voda	1 l

Pepton a kvasnicové médium se rozpustí ve studené vodě a vloží se na 20 min do autoklávu při teplotě 120°C.

### 3.5.3 Plnění testovací destičky

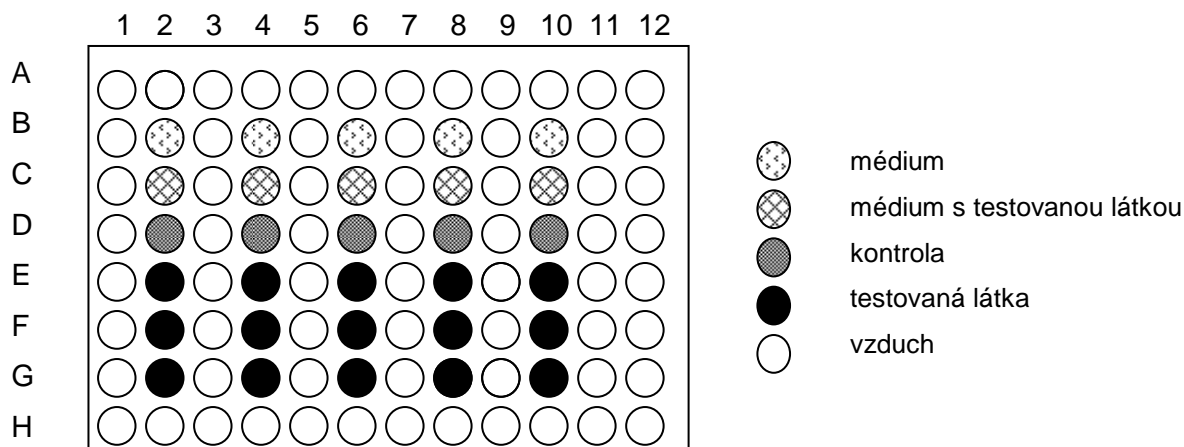
#### **Schéma plnění**

médium	180 $\mu$ l
médium + testovaná látka	120 $\mu$ l + 60 $\mu$ l
médium + <i>Tetrahymena</i>	120 $\mu$ l + 60 $\mu$ l
paralelní stanovení: 1. médium + látka + <i>Tetrahymena</i>	60 $\mu$ l + 60 $\mu$ l + 60 $\mu$ l
2.	60 $\mu$ l + 60 $\mu$ l + 60 $\mu$ l
3.	60 $\mu$ l + 60 $\mu$ l + 60 $\mu$ l

Veškerá práce spojená s plněním destiček se provádí v boxu s laminárním prouděním.

Mikrotitrační destička se plní jen v řadách B, C, D, E, F, G a ve sloupcích 2, 4, 6, 8 a 10, zbylé jamky zůstanou prázdné pro lepší růst nálevníka.

Do jamek v řadě B se mikropipetou vloží médium, v jamkách řady C se nachází médium a testovaná látka, v jamkách řady D médium a suspenze nálevníka. Řady E, F a G obsahují médium, suspenzi nálevníka i testované léčivo. Koncentrace léčiva jsou seřazeny sestupně, tj. v jamce E2, F2, G2 je nejvyšší koncentrace, v jamce E10, F10, G10 pak koncentrace nejnižší.



**Obr. 7:** Mikrotitrační destička

#### 3.5.4 Měření optické hustoty

Optická hustota se měří při 492 nm hned po připravení destičky, další měření pak po 1 hodině po 24 hodin. Mezi jednotlivými měřeními se kultura uchovává v inkubátoru při 25°C.

#### 3.5.5 Vyhodnocení

Z naměřených hodnot vytvoříme graf závislosti růstu organismu na čase pro jednotlivé koncentrace léčiva.

Ze získaných hodnot vypočítáme pro jednotlivé koncentrace léčiva % inhibice pomocí vzorce:

$$\% \text{ inhibice }_{(C1-C5)} = \left( 1 - \frac{OD_{C0} - OD_{C24}}{OD_{K0} - OD_{K24}} \right) \times 100$$

OD<sub>C0</sub>...optická hustota dané koncentrace v čase 0 hod

OD<sub>C24</sub>...optická hustota dané koncentrace v čase 24 hod

OD<sub>K0</sub>...optická hustota kontroly v čase 0 hod

OD<sub>K24</sub>...optická hustota kontroly v čase 24 hod

### **3.6 MTT test**

Příprava ředící řady vzorku i standardu léčiva i plnění mikrotitrační destičky je shodné s metodikou PROTOXKIT F. Naplněná destička se na hodinu vloží do inkubátoru při teplotě 20°C.

#### **3.6.1 Vložení MTT**

Po hodinové inkubaci se do všech jamek přidá 10 µl MTT v koncentraci 10 mg/ml. Naplněná destička se uzavře víkem a vloží se do inkubátoru na 4 hodiny při 20°C.

#### **3.6.2 Přidání DMSO**

Během inkubace došlo k metabolické redukci tetrazolové soli, MTT, a k vytvoření barevných, ve vodě nerozpustných krystalů formazanu. Pro spektrofotometrické hodnocení je zapotřebí barevné krystaly rozpustit v organickém rozpouštědle. V tomto případě se jednalo o DMSO.

#### **3.6.3 Vyhodnocení**

Spektrofotometrické hodnocení optické hustoty se vykonává po naplnění destičky a následně po 1 hod, 4,5 hod, 23 hod a 48 hod při vlnové délce 562 nm.

## 4 Výsledky

### 4.1 ALGALTOXKIT F

#### a) Ibuprofen (IBALGIN® 400 mg)

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: konstantní osvětlení 10 000 luxů, 21 - 25°C

délka testu: 72 hodin

testovaný organismus: *Selenastrum capricornutum*

**Tab. 2:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), počet buněk  
v 1 ml

	koncentrace (mmol/)	počet řas v 1 ml			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$28,83 \times 10^4$	$31 \times 10^4$
c1	8,1	$18 \times 10^4$	$22,2 \times 10^4$	$21,33 \times 10^4$	$15,5 \times 10^4$
c2	4,1	$18 \times 10^4$	$22,41 \times 10^4$	$21,5 \times 10^4$	$18,5 \times 10^4$
c3	2,05	$18 \times 10^4$	$24,5 \times 10^4$	$22 \times 10^4$	$20 \times 10^4$
c4	1,03	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$22,5 \times 10^4$	$21 \times 10^4$
c5	0,51	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$22,5 \times 10^4$	$22 \times 10^4$
c6	0,26	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$23 \times 10^4$	$22,33 \times 10^4$

**Tab. 3:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), % inhibice

	koncentrace (mmol/l)	% inhibice			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	0	0	0	0
c1	8,1	0	14,66	26	50
c2	4,1	0	13,8	25,4	40,3
c3	2,05	0	5,8	23,7	35,5
c4	1,03	0	0	22	32,3
c5	0,51	0	0	22	29
c6	0,26	0	0	20,2	28

**Tab. 4:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), počet buněk  
v 1 ml

	koncentrace (mmol/l)	počet řas v 1 ml			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$28,83 \times 10^4$	$31 \times 10^4$
c1	8,1	$18 \times 10^4$	$22,16 \times 10^4$	$21 \times 10^4$	$15,33 \times 10^4$
c2	4,1	$18 \times 10^4$	$22,33 \times 10^4$	$21 \times 10^4$	$18,5 \times 10^4$
c3	2,05	$18 \times 10^4$	$24 \times 10^4$	$22,33 \times 10^4$	$19,66 \times 10^4$
c4	1,03	$18 \times 10^4$	$25,5 \times 10^4$	$22,33 \times 10^4$	$20,67 \times 10^4$
c5	0,51	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$22,33 \times 10^4$	$20,83 \times 10^4$
c6	0,26	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$22,5 \times 10^4$	$21,83 \times 10^4$



**Tab. 5:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), % inhibice

	koncentrace (mmol/l)	% inhibice			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	0	0	0	0
c1	8,1	0	14,8	27,2	50,5
c2	4,1	0	14,1	27,2	40,3
c3	2,05	0	7,7	22,5	36,6
c4	1,03	0	1,9	22,5	33
c5	0,51	0	0	22,5	32
c6	0,26	0	0	22	29,6

**Tab. 6:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledné % inhibice obou stanovení

	koncentrace (mmol/l)	% inhibice			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
c1	8,1	0	14,73	26,6	50,25
c2	4,1	0	13,95	26,3	40,3
c3	2,05	0	6,75	23,1	36,05
c4	1,03	0	0,95	22,25	32,15
c5	0,51	0	0	22,25	30,5
c6	0,26	0	0	21,1	28,8

**b) Ibuprofen (standard)**

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: konstantní osvětlení 10 000 luxů, 21 - 25°C

délka testu: 72 hodin

testovaný organismus: *Selenastrum capricornutum*

**Tab. 7:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (standard), počet buněk v 1 ml

	koncentrace (mmol/l)	počet řas v 1 ml			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$28,83 \times 10^4$	$31 \times 10^4$
c1	8,1	$18 \times 10^4$	$19,33 \times 10^4$	$16,66 \times 10^4$	$12 \times 10^4$
c2	4,1	$18 \times 10^4$	$20,16 \times 10^4$	$19,5 \times 10^4$	$12,83 \times 10^4$
c3	2,05	$18 \times 10^4$	$21,66 \times 10^4$	$20,33 \times 10^4$	$14,33 \times 10^4$
c4	1,03	$18 \times 10^4$	$24,17 \times 10^4$	$20,5 \times 10^4$	$15,66 \times 10^4$
c5	0,51	$18 \times 10^4$	$25,5 \times 10^4$	$21 \times 10^4$	$17 \times 10^4$
c6	0,26	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$21 \times 10^4$	$19,33 \times 10^4$

**Tab. 8:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (standard), % inhibice

	koncemtrace (mmol/l)	% inhibice			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	0	0	0	0
c1	8,1	0	25	42,2	61,3
c2	4,1	0	22,5	32,4	58,6
c3	2,05	0	16,7	29,5	53,8
c4	1,03	0	7	28,9	49,5
c5	0,51	0	1,9	27,2	45,2
c6	0,26	0	0	27,2	37,6

**Tab. 9:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (standard), počet buněk v 1 ml

	koncentrace (mmol/l)	počet řas v 1 ml			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$28,83 \times 10^4$	$31 \times 10^4$
c1	8,1	$18 \times 10^4$	$20,33 \times 10^4$	$16,83 \times 10^4$	$12,5 \times 10^4$
c2	4,1	$18 \times 10^4$	$20,5 \times 10^4$	$20,5 \times 10^4$	$13 \times 10^4$
c3	2,05	$18 \times 10^4$	$22 \times 10^4$	$21 \times 10^4$	$14,88 \times 10^4$
c4	1,03	$18 \times 10^4$	$24,17 \times 10^4$	$21,67 \times 10^4$	$16,66 \times 10^4$
c5	0,51	$18 \times 10^4$	$25,5 \times 10^4$	$22 \times 10^4$	$17,66 \times 10^4$
c6	0,26	$18 \times 10^4$	$26 \times 10^4$	$22,33 \times 10^4$	$20 \times 10^4$

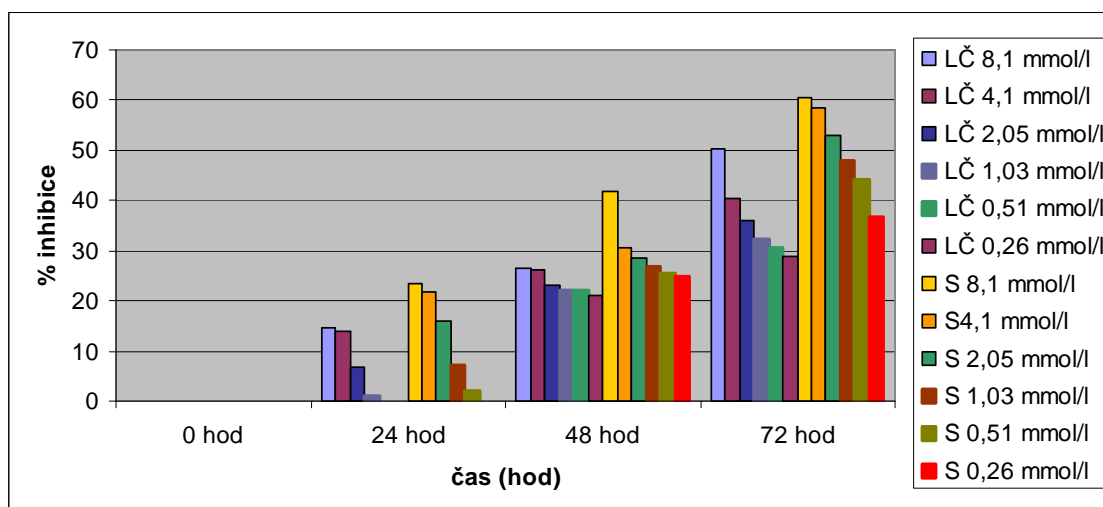
**Tab. 10:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (standard), % inhibice

	koncentrace (mmol/l)	% inhibice			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
kontrola	0	0	0	0	0
c1	8,1	0	21,8	41,6	59,8
c2	4,1	0	21,2	28,9	58,1
c3	2,05	0	15,4	27,2	52
c4	1,03	0	7	24,8	46,3
c5	0,51	0	1,9	23,7	43
c6	0,26	0	0	22,5	35,5

**Tab. 11:** ALGALTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledné % inhibice obou stanovení

	koncentrace (mmol/l)	% inhibice			
		0 hod	24 hod	48 hod	72 hod
c1	8,1	0	23,4	41,9	60,6
c2	4,1	0	21,9	30,7	58,4
c3	2,05	0	16,1	28,4	52,9
c4	1,03	0	7	26,9	47,9
c5	0,51	0	1,9	25,5	44,1
c6	0,26	0	0	24,9	36,6

**Graf.1:** ALGALTOXKIT F – srovnání % inhibice mezi ibuprofen (IBALGIN® 400 mg) a ibuprofen (standard)



Z grafu je patrné, že standard léčiva způsobil v porovnání s léčivem vyšší inhibici.

## 4.2 THAMNOTOXKIT F

### a) Ibuprofen (IBALGIN® 400 mg)

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 24 hodin

testovaný organismus: *Thamnocephalus platyurus*

**Tab. 12:** THAMNOTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	počet mrtvých organismů	počet živých organismů	% mortalita
kontrola	0	0	10	0
C1	10	10	0	100
C2	5,6	10	0	100
C3	3,1	10	0	100
C4	1,7	10	0	100
C5	0,95	9	1	90
C6	0,53	0	10	0

**Tab. 13:** THAMNOTOXKIT F - ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	počet mrtvých organismů	počet živých organismů	% mortalita
kontrola	0	0	10	0
C1	3,1	10	0	100
C2	1,7	10	0	100
C3	0,95	9	1	90
C4	0,53	0	10	0
C5	0,3	0	10	0
C6	0,17	0	10	0

**b) Ibuprofen (standard léčiva)**

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 24 hodin

testovaná organismus: *Thamnocephalus platyurus*

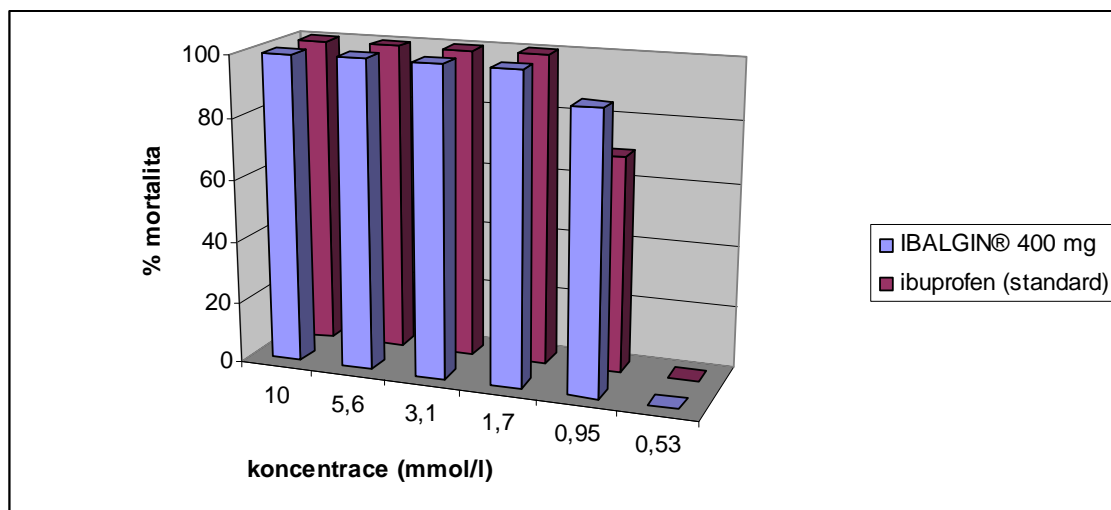
**Tab. 14:** THAMNOTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	počet mrtvých organismů	počet živých organismů	% mortalita
kontrola	0	0	10	0
C1	10	10	0	100
C2	5,6	10	0	100
C3	3,1	10	0	100
C4	1,7	10	0	100
C5	0,95	7	3	70
C6	0,53	0	10	0

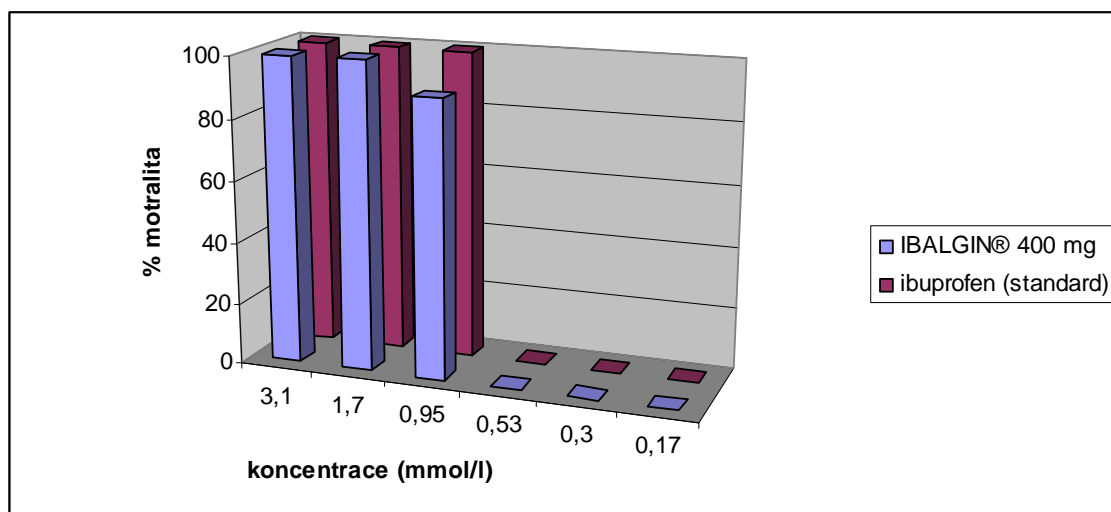
**Tab. 15:** THAMNOTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	počet mrtvých organismů	počet živých organismů	% mortalita
kontrola	0	0	10	0
C1	3,1	10	0	100
C2	1,7	10	0	100
C3	0,95	10	0	100
C4	0,53	0	10	0
C5	0,3	0	10	0
C6	0,17	0	10	0

**Graf. 2:** THAMNOTOXKIT F – srovnání % mortality mezi ibuprofen (IBALGIN® 400 mg) a ibuprofen (standard), koncentrace 10 mmol/l – 0,53 mmol/l



**Graf. 3:** THAMNOTOXKIT F – srovnání % mortality mezi ibuprofen (IBALGIN® 400 mg) a ibuprofen (standard), koncentrace 3,1 mmol/l – 0,17 mmol/l



Z obou grafů je patrné, že léčivo i standard způsobují přibližně stejnou mortalitu larev *Thamnocephalus platyurus*.



### 4.3 RAPIDTOXKIT

#### a) Ibuprofen (IBALGIN® 400 mg)

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 15 – 30 minut

testovaný organismus: *Thamnocephalus platyurus*

**Tab. 16:** RAPIDTOXKIT - ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	% živých organismů	% inhibice
kontrola	0	100	0
c1	9,6	0	100
c2	4,8	0	100
c3	2,4	0	100
c4	1,2	42	58
c5	0,6	50	50
c6	0,3	89	11
c7	0,15	100	0

**Tab. 17:** RAPIDTOXKIT - ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	% živých organismů	% inhibice
kontrola	0	100	0
c1	3,1	0	100
c2	1,55	0	100
c3	0,78	7,69	92,31
c4	0,39	50	50
c5	0,19	90,9	9,1
c6	0,09	100	0
c7	0,05	100	0

**b) Ibuprofen (standard)**

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 15 – 30 minut

testovaný organismus: *Thamnocephalus platyurus*

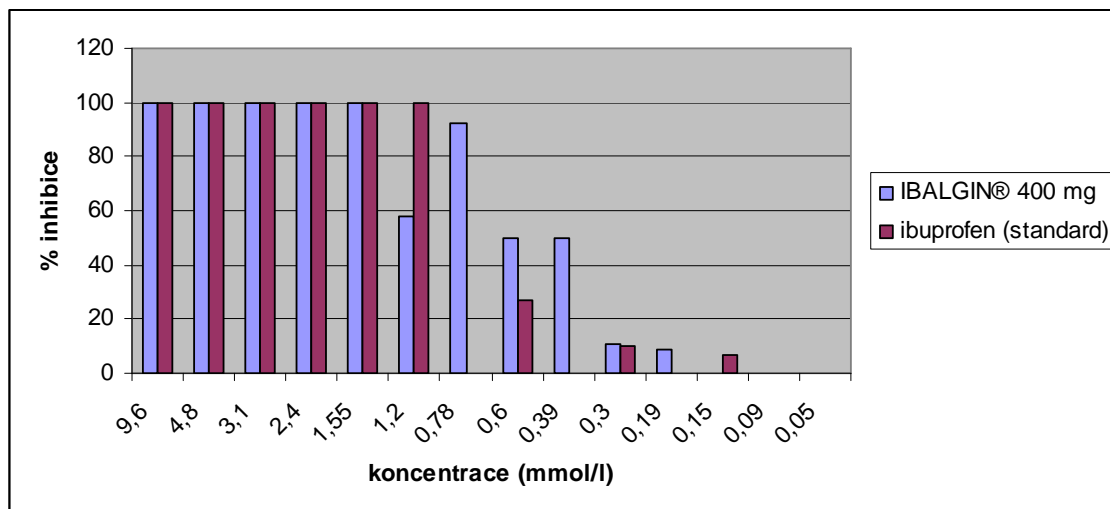
**Tab. 18:** RAPIDTOXKIT – ibuprofen (standard), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	% živých organismů	% inhibice
kontrola	0	100	0
c1	9,6	0	100
c2	4,8	0	100
c3	2,4	0	100
c4	1,2	0	100
c5	0,6	73,3	26,7
c6	0,3	90	10
c7	0,15	93	7

**Tab. 19:** RAPIDTOXKIT – ibuprofen (standard), výsledky

	koncentrace (mmol/l)	% živých organismů	% inhibice
kontrola	0	100	0
c1	3,1	0	100
c2	1,55	0	100
c3	0,78	100	0
c4	0,39	100	0
c5	0,19	100	0
c6	0,09	100	0
c7	0,05	100	0

**Graf. 4:** RAPIDTOXKIT – srovnání % inhibice mezi ibuprofen (IBALGIN® 400 mg) a ibuprofen (standard)



Z grafu je zřejmé, že IBALGIN® 400 mg působí na larvy *Thamnocephalus platyurus* více toxicky než standard léčiva.

#### 4.4 PROTOXKIT F

##### a) Ibuprofen (IBALGIN® 400 mg)

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 24 hodin

testovaný organismus: *Tetrahymena pyriformis*

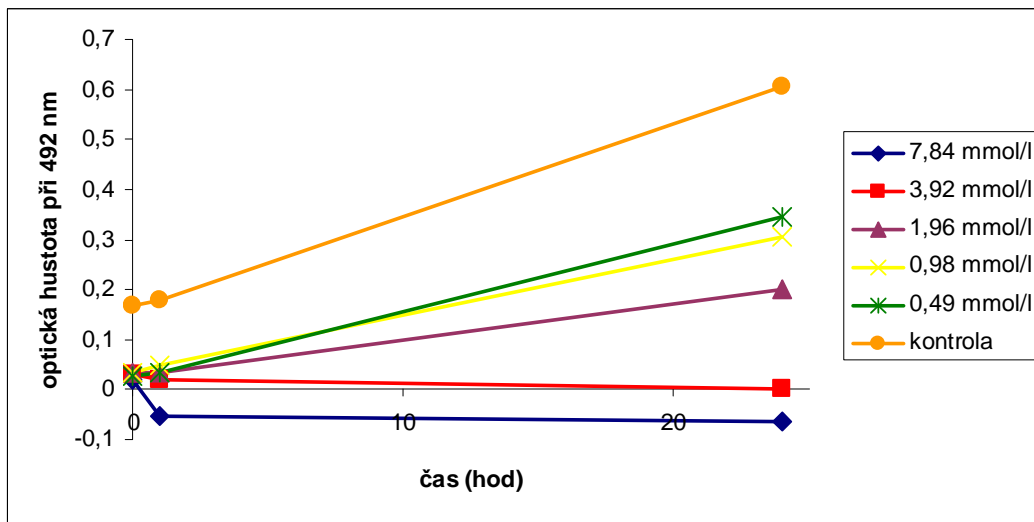
**Tab. 20:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					průměr
	7,84	3,92	1,96	0,98	0,49	
pepton	0,143	0,142	0,147	0,138	0,145	
pepton + látka	0,598	0,355	0,222	0,162	0,131	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,168	0,165	0,166	0,169	0,17	0,1676
1. stanovení	0,591	0,388	0,246	0,184	0,157	
2. stanovení	0,604	0,376	0,248	0,194	0,157	
3. stanovení	0,656	0,388	0,269	0,215	0,158	
průměr paralelního stanovení	0,617	0,384	0,2543	0,1977	0,1573	
výsledná optická hustota	0,019	0,029	0,0323	0,0357	0,0263	

**Tab. 21:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 24 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	7,84	3,92	1,96	0,98	0,49	
pepton	0,145	0,144	0,147	0,139	0,144	
pepton + látka	0,653	0,314	0,213	0,191	0,135	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,632	0,594	0,576	0,592	0,634	0,6056
1. stanovení	0,54	0,308	0,405	0,461	0,502	
2. stanovení	0,539	0,314	0,404	0,517	0,458	
3. stanovení	0,692	0,319	0,428	0,511	0,481	
průměr paralelního stanovení	0,5903	0,3137	0,4123	0,4963	0,4803	
výsledná optická hustota	-0,063	-0,0003	0,1993	0,3053	0,3453	

**Graf. 5:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 7,84 mmol/l – 0,49 mmol/l



**Tab. 22:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 7,84 mmol/l – 0,49 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
7,84	118,65
3,92	106,7
1,96	61,87
0,98	38,43
0,49	27,17

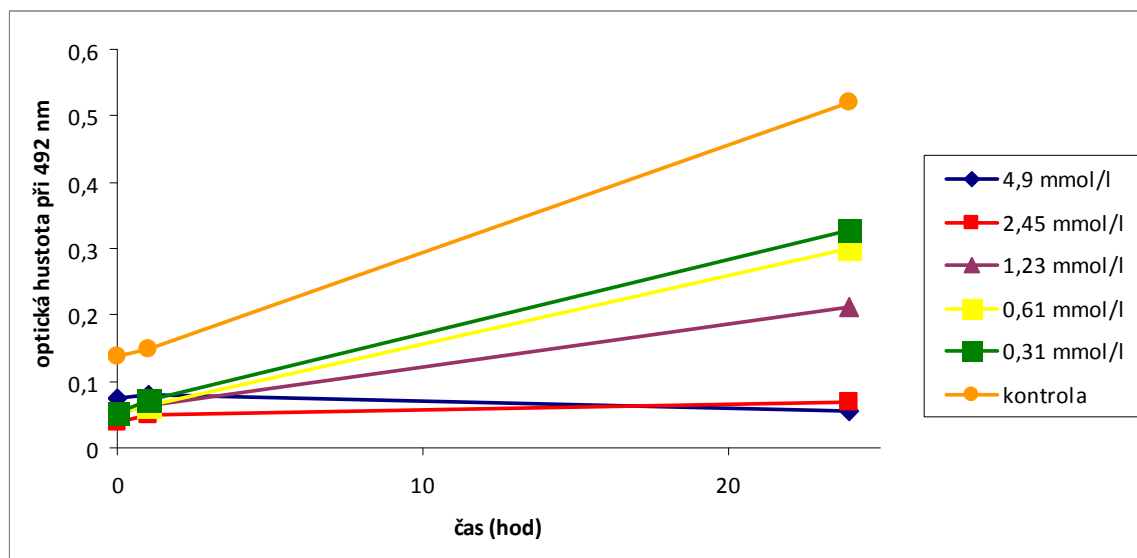
**Tab. 23:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	4,9	2,45	1,23	0,61	0,31	
pepton	0,101	0,1	0,104	0,106	0,106	
pepton + látka	0,346	0,227	0,133	0,101	0,088	
Pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,137	0,134	0,14	0,139	0,142	0,1384
1. stanovení	0,398	0,273	0,193	0,149	0,14	
2. stanovení	0,422	0,26	0,174	0,16	0,139	
3. stanovení	0,441	0,264	0,19	0,155	0,14	
průměr paralelního stanovení	0,4203	0,2657	0,1857	0,1547	0,1397	
výsledná optická hustota	0,0743	0,0387	0,0527	0,0537	0,0517	

**Tab. 24:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 24 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	4,9	2,45	1,23	0,61	0,31	
pepton	0,101	0,104	0,109	0,105	0,107	
pepton + látka	0,367	0,219	0,137	0,138	0,106	
Pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,478	0,517	0,504	0,531	0,569	0,5198
1. stanovení	0,421	0,287	0,341	0,423	0,5	
2. stanovení	0,425	0,29	0,334	0,472	0,409	
3. stanovení	0,423	0,285	0,375	0,421	0,394	
průměr paralelního stanovení	0,423	0,2873	0,35	0,4387	0,4343	
výsledná optická hustota	0,056	0,0683	0,213	0,3007	0,3283	

**Graf. 6:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 4,9 mmol/l – 0,31 mmol/l



**Tab. 25:** PROTOXKIT F – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 4,9 mmol/l – 0,31 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
4,9	104,8
2,45	92,2
1,23	57,96
0,61	35,24
0,31	27,46

**b) Ibuprofen (standard)**

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 24 hodin

testovaný organismus: *Tetrahymena pyriformis*

**Tab. 26:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledky, 0 hod

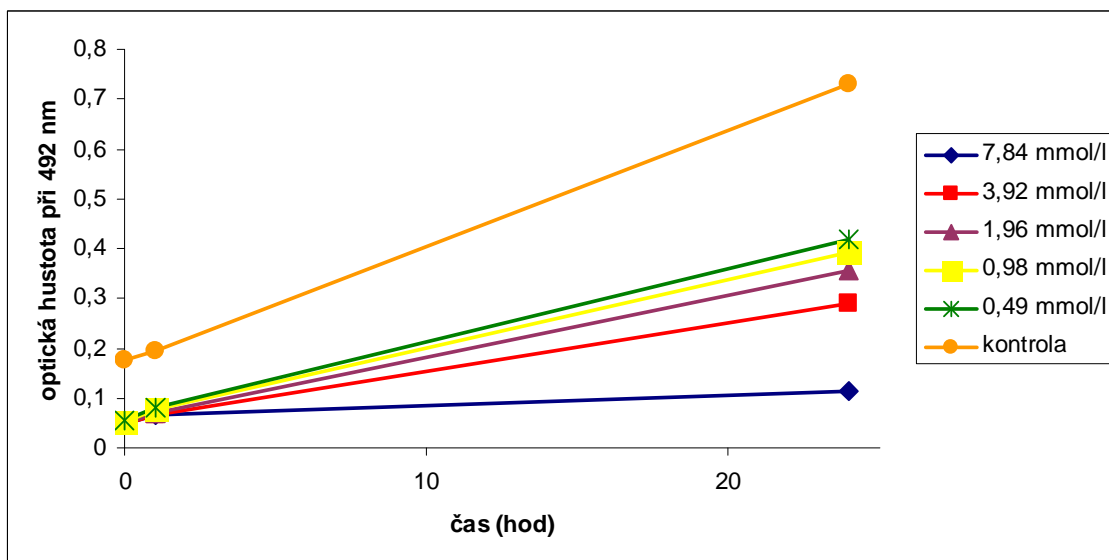
	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	7,84	3,92	1,96	0,98	0,49	
pepton	0,137	0,138	0,145	0,143	0,148	
pepton + látka	0,176	0,115	0,105	0,104	0,105	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,173	0,177	0,173	0,178	0,178	0,1758
1. stanovení	0,199	0,153	0,141	0,155	0,146	
2. stanovení	0,242	0,16	0,15	0,155	0,15	
3. stanovení	0,233	0,171	0,172	0,159	0,182	
průměr paralelního stanovení	0,2247	0,1613	0,1543	0,1563	0,1593	
OD	0,0487	0,0463	0,0493	0,0523	0,0543	

**Tab. 27:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledky, 24 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	7,8	3,92	1,96	0,98	0,49	
pepton	0,136	0,138	0,143	0,143	0,144	
pepton + látka	0,118	0,108	0,108	0,153	0,124	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,726	0,729	0,724	0,711	0,764	0,7308
1. stanovení	0,165	0,357	0,432	0,546	0,568	
2. stanovení	0,186	0,395	0,428	0,58	0,502	
3. stanovení	0,347	0,446	0,529	0,514	0,553	
průměr paralelního stanovení	0,2327	0,3993	0,463	0,5467	0,541	
výsledná optická hustota	0,1147	0,2913	0,355	0,3937	0,417	



**Graf. 7:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 7,84 mmol/l – 0,49 mmol/l



**Tab. 28:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 7,84 mmol- 0,49 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
7,84	88,1
3,92	55,9
1,96	44,9
0,98	38,5
0,49	34,65

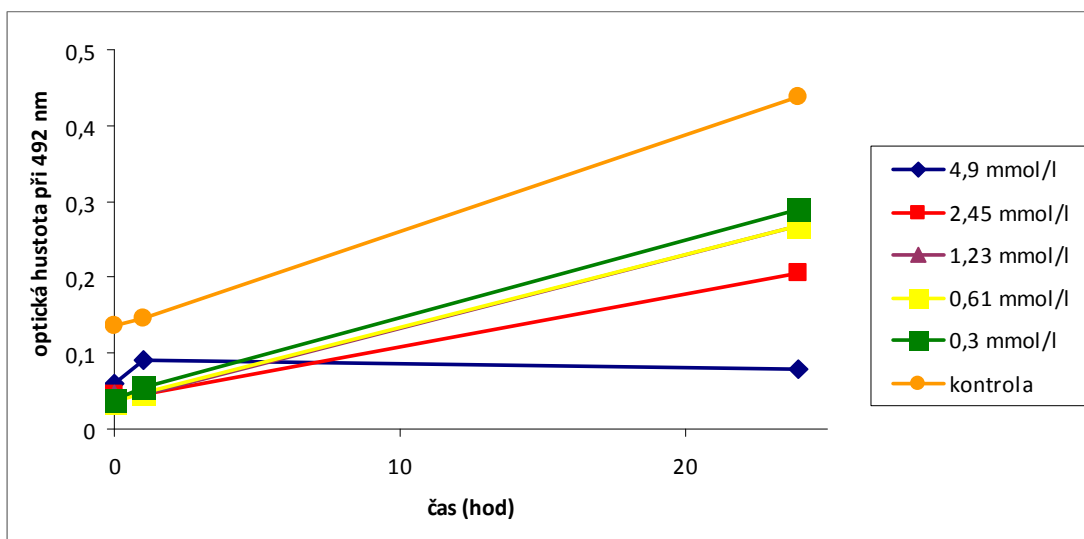
**Tab. 29:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	4,9	2,45	1,23	0,61	0,31	
pepton	0,104	0,103	0,102	0,102	0,103	
pepton + látka	0,135	0,089	0,08	0,081	0,083	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,133	0,133	0,135	0,142	0,141	0,1368
1. stanovení	0,182	0,131	0,126	0,116	0,12	
2. stanovení	0,235	0,123	0,123	0,118	0,121	
3. stanovení	0,171	0,146	0,125	0,12	0,124	
průměr paralelního stanovení	0,196	0,1333	0,1247	0,118	0,1217	
výsledná optická hustota	0,061	0,0443	0,0447	0,037	0,0387	

**Tab. 30:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), výsledky, 24 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	4,9	2,45	1,23	0,61	0,31	
pepton	0,106	0,104	0,106	0,102	0,105	
pepton + látka	0,086	0,088	0,093	0,088	0,095	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,462	0,409	0,343	0,446	0,528	0,4376
1. stanovení	0,15	0,276	0,387	0,357	0,409	
2. stanovení	0,165	0,273	0,352	0,331	0,374	
3. stanovení	0,179	0,333	0,345	0,38	0,367	
průměr paralelního stanovení	0,1647	0,294	0,3613	0,356	0,3833	
výsledná optická hustota	0,0787	0,206	0,2683	0,268	0,2883	

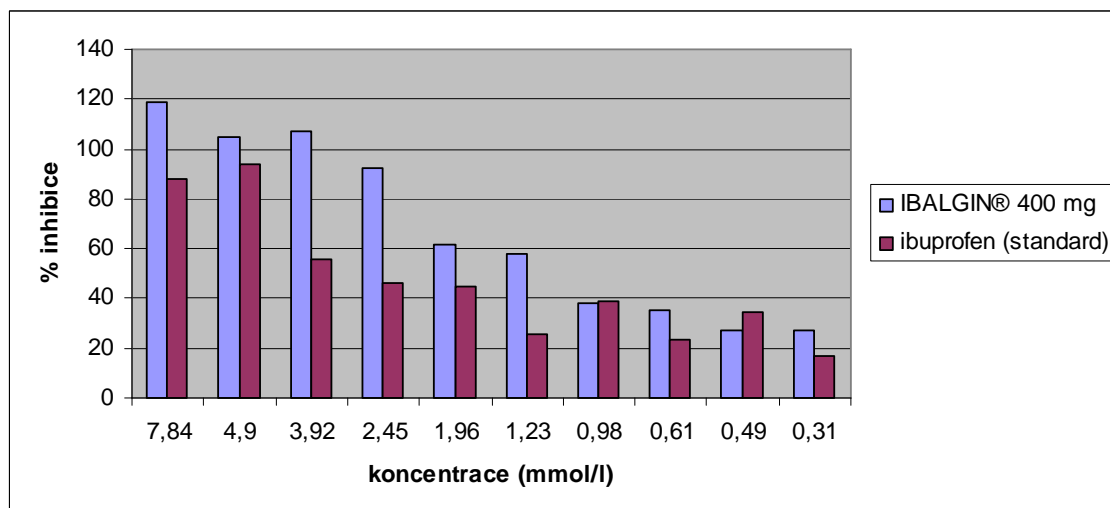
**Graf. 8:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 4,9 mmol/l – 0,31 mmol/l



**Tab. 31:** PROTOXKIT F – ibuprofen (standard), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 4,9 mmol- 0,31 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
4,9	94,13
2,45	46,25
1,23	25,64
0,61	23,2
0,31	17

**Graf.9:** PROTOXKIT F – srovnání % inhibice mezi ibuprofen (IBALGIN® 400 mg) a ibuprofen (standard)



Z grafu je zřejmé, že IBALGIN® 400 mg způsobí vyšší inhibice než odpovídající standard.

#### 4.5 MTT test

##### a) Ibuprofen (IBALGIN® 400 mg)

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 48 hodin

testovaný organismus: *Tetrahymena pyriformis*

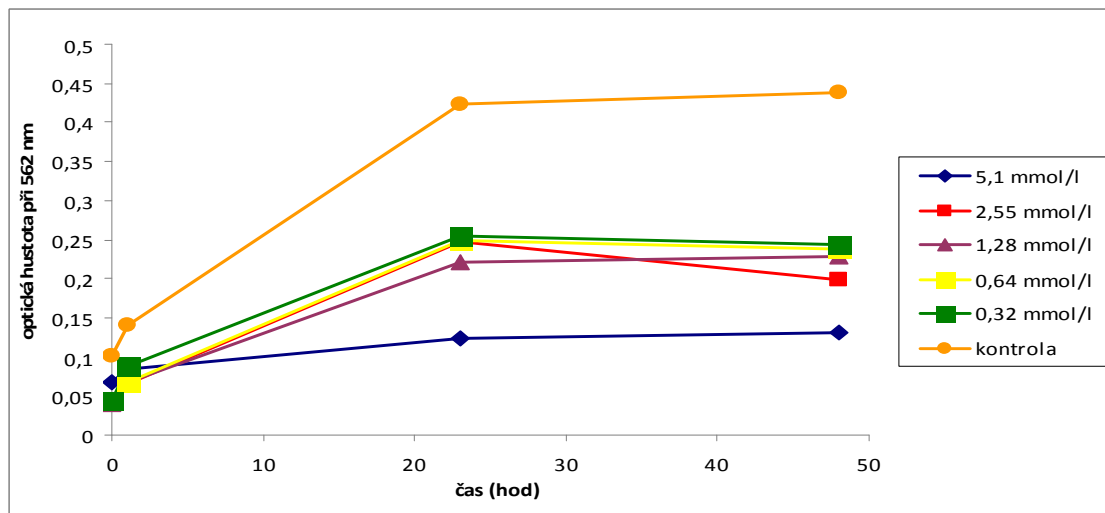
**Tab. 32:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,07	0,069	0,067	0,066	0,068	
pepton + látka	0,361	0,149	0,083	0,118	0,065	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,097	0,105	0,103	0,102	0,106	0,1026
1. stanovení	0,427	0,192	0,129	0,159	0,11	
2. stanovení	0,406	0,189	0,126	0,16	0,113	
3. stanovení	0,441	0,19	0,123	0,156	0,113	
průměr paralelního stanovení	0,4247	0,1903	0,126	0,1583	0,112	
výsledná optická hustota	0,0637	0,0413	0,043	0,0403	0,047	

**Tab. 33:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 48 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,07	0,069	0,066	0,066	0,382	
pepton + látka	0,321	0,211	0,152	0,176	0,139	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,446	0,445	0,455	0,459	0,391	0,4392
1. stanovení	0,38	0,416	0,416	0,419	0,374	
2. stanovení	0,384	0,416	0,389	0,428	0,462	
3. stanovení	0,387	0,469	0,378	0,436	0,431	
průměr paralelního stanovení	0,3837	0,4337	0,3943	0,4277	0,4223	
výsledná optická hustota	0,0627	0,2227	0,2423	0,2517	0,2833	

**Graf. 10:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l



**Tab. 34:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
5,1	100,3
2,55	46,13
1,28	40,78
0,64	37,22
0,32	29,79

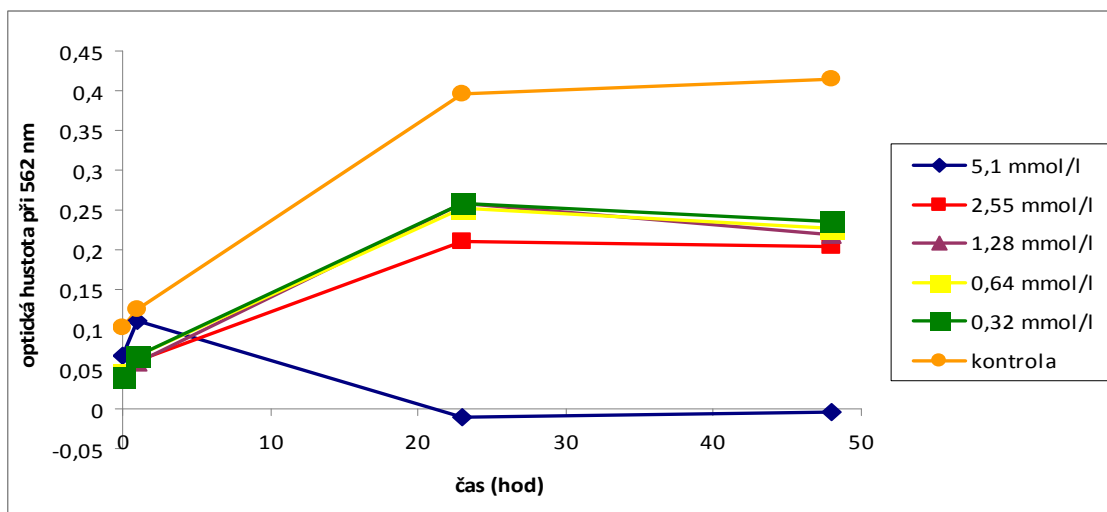
**Tab. 35:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,063	0,063	0,064	0,066	0,068	
pepton + látka	0,388	0,14	0,07	0,063	0,103	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,101	0,1	0,105	0,101	0,099	0,1012
1. stanovení	0,524	0,174	0,11	0,107	0,145	
2. stanovení	0,395	0,185	0,117	0,105	0,141	
3. stanovení	0,444	0,182	0,116	0,11	0,142	
průměr paralelního stanovení	0,035	0,033	0,034	0,033	0,037	
výsledná optická hustota	0,0663	0,0403	0,0443	0,0443	0,0397	

**Tab. 36:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), výsledky, 48 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,077	0,17	0,163	0,089	0,068	
pepton + látka	0,374	0,23	0,184	0,175	0,195	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,411	0,418	0,431	0,395	0,419	0,4148
1. stanovení	0,322	0,429	0,432	0,417	0,402	
2. stanovení	0,388	0,421	0,387	0,4	0,431	
3. stanovení	0,392	0,455	0,391	0,39	0,456	
průměr paralelního stanovení	0,035	0,035	0,035	0,034	0,037	
výsledná optická hustota	-0,007	0,205	0,2193	0,2273	0,2347	

**Graf. 11:** MTT – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l



**Tab. 37:** MTT test – ibuprofen (IBALGIN® 400 mg), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
5,1	123,28
2,55	47,5
1,28	44,2
0,64	41,65
0,32	37,82



**b) Ibuprofen (standard)**

hodnocení akutní toxicity

podmínky testu: tma, 25°C

délka testu: 48 hodin

testovaný organismus: *Tetrahymena pyriformis*

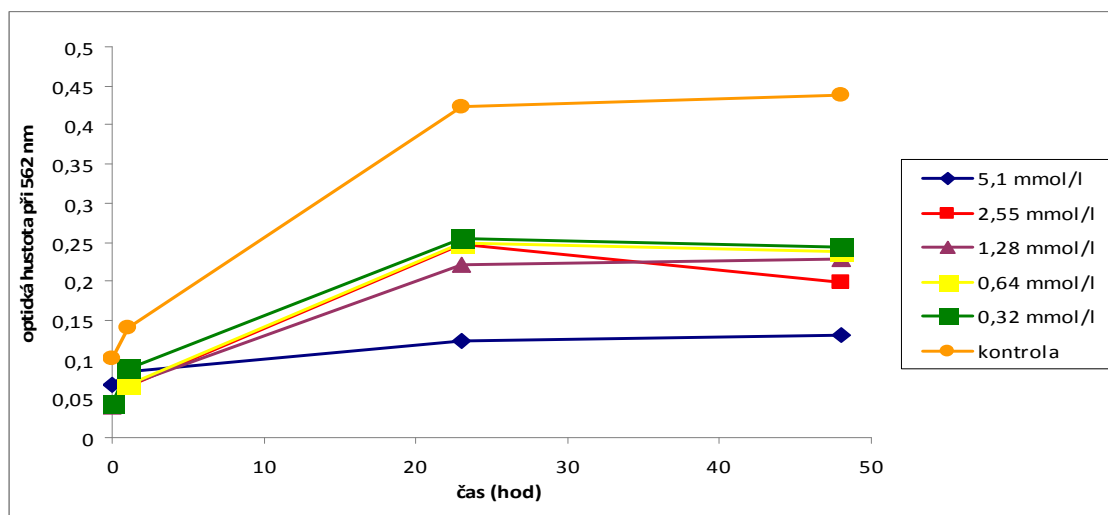
**Tab. 38:** MTT test – ibuprofen (standard), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,07	0,069	0,067	0,068	0,07	
pepton + látka	0,109	0,056	0,069	0,054	0,052	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,099	0,108	0,099	0,1	0,1	0,1012
1. stanovení	0,149	0,098	0,111	0,096	0,097	
2. stanovení	0,228	0,097	0,104	0,095	0,093	
3. stanovení	0,15	0,097	0,108	0,1	0,094	
průměr paralelního stanovení	0,1757	0,0973	0,1077	0,097	0,0947	
výsledná optická hustota	0,0667	0,0413	0,0387	0,043	0,0427	

**Tab. 39:** MTT test – ibuprofen (standard), výsledky, 48 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,071	0,068	0,066	0,066	0,069	
pepton + látka	0,161	0,15	0,152	0,152	0,162	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,467	0,455	0,423	0,431	0,412	0,4376
1. stanovení	0,303	0,374	0,399	0,387	0,454	
2. stanovení	0,203	0,309	0,382	0,371	0,401	
3. stanovení	0,369	0,364	0,362	0,413	0,364	
průměr paralelního stanovení	0,2917	0,349	0,381	0,3903	0,4063	
výsledná optická hustota	0,1307	0,199	0,229	0,2383	0,2443	

**Graf. 12:** MTT test – ibuprofen (standard), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l



**Tab. 40:** MTT test – ibuprofen (standard), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
5,1	80,98
2,55	53,13
1,28	43,42
0,64	41,93
0,32	40,05

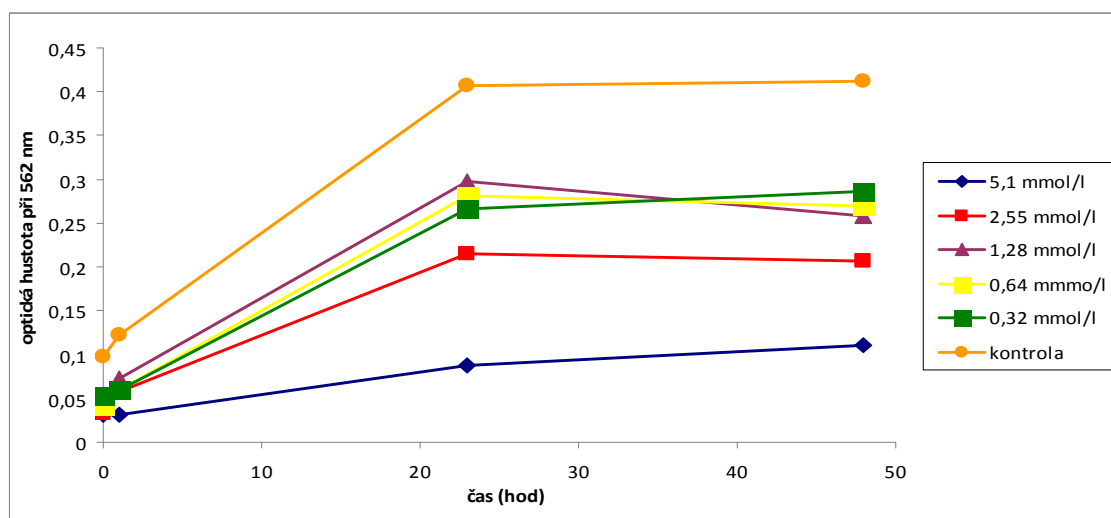
**Tab. 41:** MTT test – ibuprofen (standard), výsledky, 0 hod

	koncentrace (mmol/l)					Průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,06	0,06	0,057	0,057	0,066	
pepton + Látka	0,107	0,063	0,048	0,053	0,047	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,091	0,098	0,111	0,095	0,095	0,098
1. stanovení	0,101	0,091	0,096	0,094	0,105	
2. stanovení	0,134	0,096	0,096	0,092	0,1	
3. stanovení	0,179	0,101	0,098	0,099	0,095	
průměr paralelního stanovení	0,138	0,096	0,0967	0,095	0,1	
výsledná optická hustota	0,031	0,033	0,0487	0,042	0,053	

**Tab. 42:** MTT test – ibuprofen (standard), výsledky, 48 hod

	koncentrace (mmol/l)					průměr
	5,1	2,55	1,28	0,64	0,32	
pepton	0,066	0,065	0,232	0,064	0,068	
pepton + látka	0,152	0,152	0,162	0,154	0,16	
pepton + <i>T. pyriformis</i>	0,502	0,361	0,522	0,394	0,277	0,4112
1. stanovení	0,172	0,339	0,414	0,403	0,508	
2. stanovení	0,32	0,352	0,401	0,431	0,43	
3. stanovení	0,297	0,384	0,444	0,439	0,399	
průměr paralelního stanovení	0,263	0,3583	0,4197	0,4243	0,4457	
výsledná optická hustota	0,111	0,2063	0,2577	0,2703	0,2857	

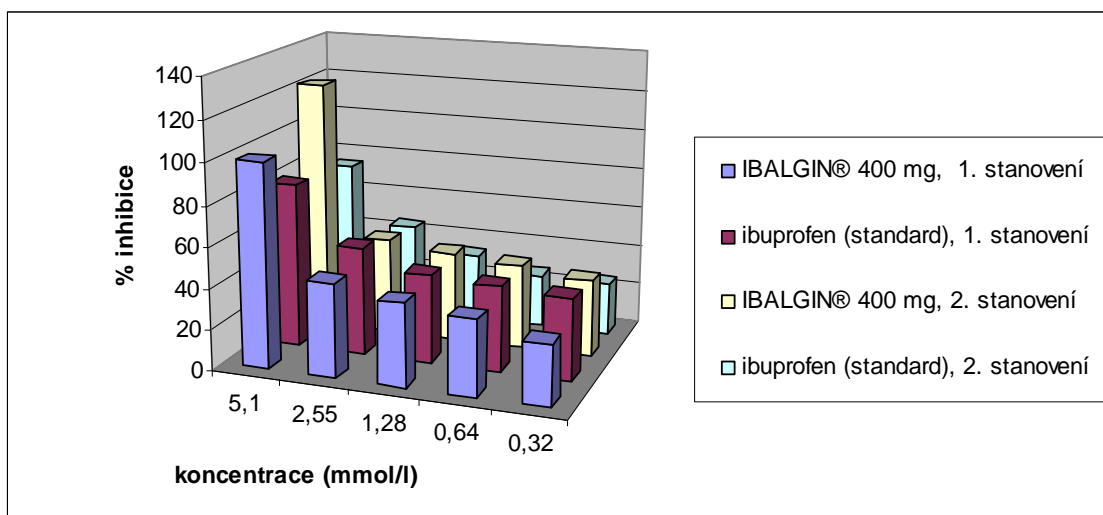
**Graf. 13:** MTT test – ibuprofen (standard), závislost optické hustoty na čase, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l



**Tab. 43:** MTT test – ibuprofen (standard), % inhibice nálevníka *Tetrahymena pyriformis*, koncentrace 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l

koncentrace (mmol/l)	% inhibice
5,1	74,46
2,55	44,66
1,28	33,27
0,64	27,1
0,32	25,71

**Graf.14:** MTT – srovnání % inhibice mezi ibuprofen (IBALGIN® 400 mg) a ibuprofen (standard)



Graf ukazuje, že léčivo i standard způsobují přibližně stejnou inhibici.

## 5 Diskuse

Zelená řasa *Selenastrum capricornutum*, koryš *Thamnocephalus platyurus* a nálevník *Tetrahymena pyriformis* byly použity pro zhodnocení možného ekotoxikologického působení léčiva IBUPROFEN® 400 mg s účinnou látkou ibuprofen.

Tím, že je toto léčivo potaženo světle fialově červeným filmem, byla počáteční koncentrace zvolena tak, aby byl vzorek co nejsvětlejší a mohly být pod mikroskopem pozorovány testované organismy. Po rozpuštění nebyl vzorek ani standard léčiva filtrovány, protože by mohly na filtru ulpět kousky stanovovaných látek.

Ibuprofen nepatří k léčivům, na kterých by byly provedeny rozsáhlé ekotoxikologické studie.

Princip ekotoxikologických studií spočívá ve zhodnocení efektu testované látky na životní prostředí. Z tohoto důvodu je nezbytně nutné použít testy všech trofických úrovní (viz. přednášky „Monitorování životního prostředí“).

Některé testy byly zaměřeny na zjišťování mortality, jiné na zhodnocení inhibice. Při srovnání přibližně stejných koncentrací léčiva a standardu ze všech provedených testů bylo zjištěno, že v nejvyšších koncentracích byla nejvyšší inhibice vyhodnocena testem PROTOXKIT F a v nejnižších koncentracích nejnižší mortalita testem THAMNOTOXKIT F.

Bohužel z výsledků hodnocených testů nemohla být vypočítána hodnota  $LC_{50}$ , případně  $EC_{50}$ . Bylo by potřeba testy vykonat ještě s nižšími koncentracemi léčiva i standardu a s jemnějším typem ředění. To ale z časových důvodů nebylo možné.

Jako zástupce producentů byla vybrána zelená řasa *Selenastrum capricornutum*, pomocí níž se v testu ALGALTOXKIT F hodnotí inhibice

růstu této řasy v přítomnosti toxinu. Koncentrace léčiva i standardu byly v rozmezí 8,1 mmol/l – 0,26 mmol/l. Výsledky ukazují, že standard léčiva způsoboval vyšší inhibici než léčivo. Je to dáno vyšší citlivostí řasy k organickému rozpouštědлу.

Jay (1996) uvádí, že u testů používaných pro zhodnocení akutní toxicity je maximální limit organického rozpouštědla 0,05%. V praxi se ale používají koncentrace rozpouštědla vyšší (Jay, 1996).

Cleuvers (2004) zjišťuje toxicitu 4 nesteroidních antiflogistik: diclofenac, ibuprofen, naproxen a acetylsalicylová kyselina. Akutní toxicitu sleduje na korýši *Daphnia* a na řase *Scenedesmus subspicatus*. Nalezl jen 2 léčiva, která by mohla být potencionálně škodlivá k vodním organismům. Těmito látkami jsou diklofenak a acetylsalicylová kyselina. Ibuprofen dosáhl hodnot  $EC_{50}$  v řasovém testu 342,2 mg/l a v *Daphnia* testu 101,2 mg/l (Cleuvers, 2004).

**Tab. 44:** Klasifikace látek podle hodnot  $EC_{50}$  (převzato od Cleuvers, 2004)

$EC_{50}$	Toxický účinek
<1 mg/l	velmi toxický
1 – 10 mg/l	toxický
10 – 100 mg/l	škodlivý
> 100 mg/l	neklasifikovaný

Skupina kolem Ferrari (2004) hodnotí ekotoxicitu 6 léčiv: karbamazepin, klofibrová kyselina, diklofenak, ofloxacin, propranolol a sulfametoxazol. Za testované organismy byly vybrány: bakterie *Vibrio fischeri*, korýši *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia*, z řas *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Synechococcus leopoldensis*, embryo ryby *Danio rerio*. Hodnoty akutní toxicity vyjádřené hodnotou  $EC_{50}$  byly velmi

různorodé. Dosahovaly hodnot v rozmezí > 200 mg/l (klofibrová kyselina, *Daphnia* test) do 10 µg/l (ofloxacin, test na bakteriích) (Ferrari a kol., 2004).

Cleuvers (2003) zkoumá účinky klofibrové kyseliny, karbamazepinu, propranololu, metoprololu, soli ibuprofenu, diklofenakové soli, naproxenové soli, kaptoprilu a metforminu na korýši *Daphnia magna* a zelené řase *Pseudokirchneriella subcapitata* a vyšší rostlině *Lemna minor*. Výsledná toxicita testovaných léčiv byla značně nesourodá. Hodnoty EC<sub>50</sub> se pohybovaly v rozmezí 7,5 mg/l (propranolol) do 174 mg/l (naproxen) v *Daphnia* testu; 5,8 mg/l (propranolol) až > 320 mg/l (metformin a naproxen) v řasovém testu a 7,5 mg/l (diklofenak) po > 320 mg/l (metoprolol) v *Lemna* testu. Hodnotí růstový inhibiční test s *Lemna* je velmi užitečný a sloužící jako dodatečný zdroj informací o fototoxicitě na vyšších rostlinách (Cleuvers, 2003).

**Tab 45:** Zhodnocení EC<sub>50</sub> na korýši *Daphnia*, zelené řase *Desmodesmus* a vyšší rostlině *Lemna* (převzato od Cleuvers, 2003)

Test substance	EC <sub>50</sub> (mg l <sup>-1</sup> )		
	<i>Daphnia</i>	<i>Desmodesmus</i>	<i>Lemna</i>
Clofibrinic acid	72	115	12.5
Carbamazepine	> 100	74	25.5
Ibuprofen-Na	108	315	22
Diclofenac-Na	68	72	7.5
Naproxen-Na	174	> 320	24.2
Captopril	> 100	168	25
Metformin	64	> 320	110
Propranolol	7.5	5.8	114
Metoprolol	> 100	7.3	> 320

Zástupce konzumentů korýš *Thamnocephalus platyurus* byl hodnocen ve dvou akutních testech toxicity – THAMNOTOXKIT F a



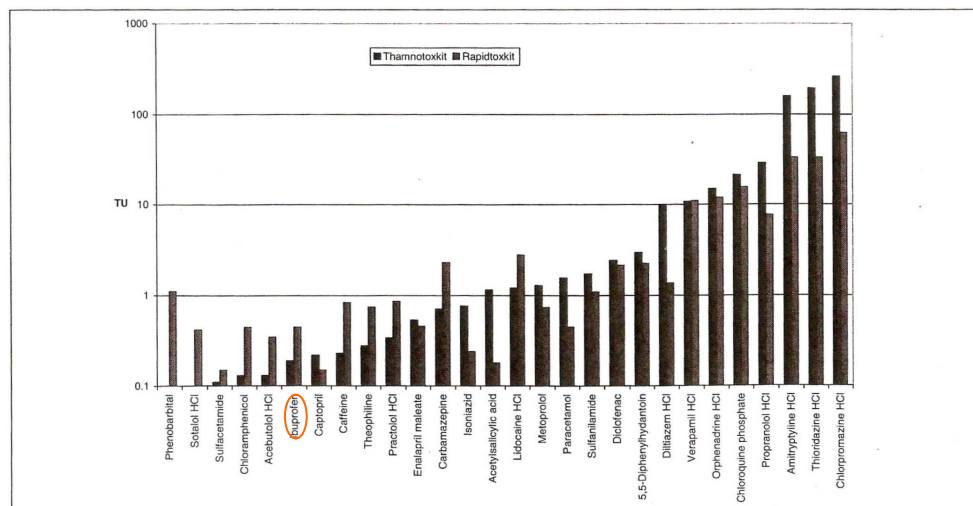
RAPIDTOXKIT. Pomocí mikrobiotestu THAMNOTOXKIT F se hodnotí mortalita larev tohoto korýše. Koncentrace léčiva IBALGIN® 400 mg a standardu se nacházely v rozmezí 10 mmol/l – 0,17 mmol/l. Obě látky způsobovaly přibližně stejnou mortalitu.

RAPIDTOXKIT je rychlý screeningový test pro rychlou identifikaci cizorodých látek. Larvy *Thamnocephalus platyurus* jsou staré nejméně 30 hodin, jelikož je potřeba, aby měly vyvinut trávicí trakt. Pomocí tohoto testu se hodnotí inhibice příjmu potravy (červených mikrosfér) korýšem. Oba vzorky byly hodnoceny v rozmezí koncentrací 9,6 mmol/l – 0,05 mmol/l. Získané hodnoty ukazují, že léčivo způsobilo vyšší inhibice než standard. Při porovnání výsledků získaných z obou testů se jeví mikrobiotest RAPIDTOXKIT citlivější. Tento falešně pozitivní výsledek je způsoben tím, že trávicí trakt larev je plný léčiva a tudíž už nepřijímají mikrosféry.

Nalecz – Jawecki (2006) srovnává toxicitu 28 standardů léčiv pomocí testů THAMNOTOXKIT F a RAPIDTOXKIT. Oba mikrobiotesty zařadily 67% léčiv do stejné toxické třídy, což značí, že se oba testy navzájem vyrovnávají.

Nesteroidní antiflogistika ovlivňovala korýše jen při vysokých koncentracích. Nejvíce toxickým léčivem z této skupiny byl diklofenak (Nalecz – Jawecki, 2006).

**Tab. 46:** Zhodnocení toxicity testovaných standardů léčiv (převzato od Nalecz – Jaweck, 2006)



TU...toxická jednotka

Skupina kolem Centeno (1995) hodnotí 10 čistých sloučenin, 4 výluhy z pevných odpadů a 5 čistých vodních sedimentů na larvách *Thamnocephalus platyurus* a *Streptocephalus proboscideus*. Výluhy a sedimenty byly získány z biomonitoringu ve Flandrech (Belgie). Hodnotí vhodnou délku líhnutí cyst *Thamnocephalus platyurus*. Optimální se zdá být inkubace 20 hodin, larvy starší 24 hodin umíraly v kontrolách. Při porovnávání čistých vzorků, výluhů a sedimentů vykazovaly larvy *Thamnocephalus platyurus* stejnou nebo i vyšší citlivost v porovnání s *Streptocephalus proboscideus* (Centeno a kol., 1995).

Andrea Törökne (2006) aplikovala a ovlivňovala experimentální podmínky pro zhodnocení akutní toxicity několika vzorků povrchové, podzemní, pitné vody a sedimentů vody čisté. Porovnávala jejich toxicity pomocí larev *Thamnocephalus platyurus* ve dvou testech toxicity: THAMNOTOXKIT F a RAPIDPOXKIT. Všechny vzorky sedimentu čisté

vody nevykazovaly toxicitu v obou testech. Voda z kohoutku naopak toxická byla, ale ukázalo se, že příčinou je přítomnost volného chlóru. 2 vzorky z povrchové vody vykazovaly velmi toxický efekt díky obsahu stroncia a uranu. Další vzorek povrchové vody obsahující kadmium a zinek vykazoval toxicitu jen pro THAMNOTOXKIT F. Vliv těchto látek se projevil až po delší době působení na korýše. V tomto testu byly objeveny 2 falešně pozitivní výsledky. Prvním vzorkem byla voda z kohoutku obsahující volný chlór, druhým pak vzorek s přídáním kyselinou citronovou a sníženým pH, které zapříčinily toxicitu (Törökne, 2006).

Brun a kol. (2006) se zabývají hodnocením tekutého odpadu z 8 čističek odpadních vod v Kanadě. Detekovali 2 kyseliny a 10 neutrálních léčiv. Akutní toxicita byla detekována pomocí korýše *Daphnia magna* a bakterie *Vibrio fischeri*. Nebyl pozorován žádný toxický účinek ani při nejvyšších testovaných koncentracích (Brun a kol., 2006).

Z řad destruentů byl vybrán nálevník *Tetrahymena pyriformis*. I na něm byly hodnoceny 2 testy toxicity. Vedle klasického testu PROTOXKIT F byl proveden i MTT test, který se široce používá pro zjištění toxického působení na buňku a také pro zhodnocení účinku protirakovinných léčiv na nádorové buňky. Test je založen na redukci tetrazolové soli (MTT) mitochondriální dehydrogenasou živých buněk ve formazan, jenž představuje ve vodě nerozpustnou látku. Pomocí organického rozpouštědla jsou krystaly formazanu rozpuštěny a následně vyhodnoceny za použití spektrofotometrického měření.

Zvolené koncentrace se nacházely v rozmezí 5,1 mmol/l – 0,32 mmol/l. Z výsledků je patrné, že léčivo i standard vykazují přibližně stejnou inhibici. Při srovnání hodnot s výsledky z PROTOXKIT F lze pozorovat přibližně stejné hodnoty.

Skupina kolem Dias (1999) hodnotí provedení MMT testu. Nalezené optimální podmínky jsou následovné: koncentrace MTT 10 mg/ml, 4 hodiny inkubace po přidání MTT při 20°C a měření optické hustoty po 30 minut inkubace po přidání DMSO. Spektrofotometrické vyhodnocení bylo provedeno při 550 nm (Dias a kol.,1999).

Při měření optické hustoty léčiva IBALGIN® 400 mg a standardu ibuprofen byla použita vlnová délka 562 nm, jelikož použitý reader nedisponoval touto vlnovou délkou.

Sauvant a kol. (1995b) popisuje použití metody „mikrodestičková metoda“, která se vyrovnává použití konvenčních kultivačních lahví. Při použití lahvé metody je nálevník *Tetrahymena pyriformis* inkubována v 100 ml peptonu 15 hodin a teprve pak je přímo přidán do lahve s testovanou látkou. Naopak při použití mikrodestičkové metody probíhá inkubace nálevníka jen hodinu a následuje přidání kultury k testované látce a takto upravený vzorek se rozdělí do 96 jamkové mikrodestičky (Sauvant a kol.,1995b).

Zilberg a Sinai (2006) použili MTT test s využitím *Tetrahymena pyriformis* k hodnocení několika chemoterapeutik: formalin, malachitová zeleň, bromex, chloramin – T, peroxid vodíku, síran měďnatý a chlorid sodný. Zjistili, že *Tetrahymena* byla citlivá k formalinu, chloraminu – T, peroxidu vodíku, síranu měďnatému a chloridu sodnému. K bromexu a malachitové zeleni byla rezistentní (Zilberg a kol., 2006).

PROTOXKIT F je 24 hodinový test inhibice růstu využívající nálevníka *Tetrahymena pyriformis* (Protoxkit, 1998). Princip ekotoxikologického testu spočívá v přeměně substrátu nálevníkem v biotu (Nalecz – Jawecki a kol.,2003).

Koncentrace obou vzorků se pohybovala v rozmezí 7,84 mmol/l – 0,31 mmol/l. Získané hodnoty ukazují, že léčivo vykazuje vyšší inhibici než standard.

Nalecz – Jawecki a Sawicki (2003) porovnávají pomocí dvou protozoí *Tetrahymena termophila* a *Spirostomum ambiguum* 20 standardů léčiv ze skupiny analgetik, kardiovaskulárního systému, antibakteriálních chemoterapeutik a léčiv ovlivňujících nervový systém. Obě protozoa byla spíše necitlivá k analgetikům (paracetamol, acetylsalicylová kyselina). Léčiva používaná k léčbě kardiovaskulárních nemocí (propranolol, verapamil, digoxin) vykazovala větší citlivost k *Spirostomum ambiguum*. Toxicita digoxinu byla podobná u obou testovaných organismů. Léčiva ovlivňující nervový systém (tioridazin, amitriptylin, orfenadrin) byla spíše citlivá k *Spirosomum ambiguum*. Toxicita antibakteriálních chemoterapeutik (sulfacetamid, sulfanilamid, chloramfenikol) k testovaným protozoím byla nízká (Nalecz – Jawecki a kol., 2003).

Skupina kolem Pauli (1993) zjišťuje pomocí *Tetrahymena termophila* toxicitu 36 sloučenin používaných v průmyslu. Porovnává výslednou citlivost testovaného organismu s jinými druhy organismů. Popisuje, že působením toxinu na buněčné kultury nálevníka se snižuje jednak rychlost rozmnožování, jednak hustota populace po 48 hodinách, což má za následek neschopnost zužítkovat potravu (Pauli a kol., 1993).

**Tab 45:** Zhodnocení citlivosti testovaných organismů v porovnání s jinými druhy testovaných organismů (převzato od Pauli a kol, 1993)

% effect	Test species	% most sensitive	<i>n</i>	Compared test systems
50	<i>Tetrahymena</i>	29	82	algae, fish, <i>Daphnia</i>
	algae	51	82	<i>Tetra.</i> , fish, <i>Daphnia</i>
	fish	53	78	<i>Tetra.</i> , algae, <i>Daphnia</i>
	<i>Daphnia</i>	68	80	<i>Tetra.</i> , algae, fish
0	fish	40	65	<i>Tetrahymena</i> , <i>Daphnia</i>
	<i>Tetrahymena</i>	56	63	fish, <i>Daphnia</i>
	<i>Daphnia</i>	57	62	<i>Tetrahymena</i> , fish

n...počet stejných hodnot s různými druhy a chemikáliemi

Citace literatury je zjednodušena použitím kombinované formy citování.

## 6 Závěr

Cílem studie léčiva IBALGIN® 400 mg s léčivou látkou ibuprofen bylo zjistit možné ekotoxikologické riziko, jež tato látka může představovat pro životní prostředí. Zjištěné výsledky byly porovnány se standardem tohoto léčiva.

Jako testované organismy byly vybrány: zelená řasa *Selenastrum capricornutum*, korýš *Thamnocephalus platyurus* a nálevník *Tetrahymena pyriformis*.

Z řad producentů byla vybrána zelená řasa *Selenastrum capricornutum*. Testy akutní toxicity jsou hodnoceny pomocí ALGALTOXKIT F. Principem metody je inhibice růstu řas v přítomnosti toxinu. Počet řasových buněk v 1 ml se zjišťuje pomocí Bürknerovy komůrky po 24, 48 a 72 hodinách. Koncentrace léčiva i standardu se nacházely v rozmezí 8,1 mmol/l – 0,26 mmol/l. Nejvyšší koncentrace standardu způsobil po 72 hodinách inhibici 59,8 %, zatímco léčivo 50,25 %. Nejnižší koncentrace standardu způsobila inhibici 36,6 %, léčivo 28,8 %.

*Thamnocephalus platyurus* byl využit ve dvou ekotoxikologických testech. Pomocí THAMNOTOXKIT F se hodnotí mortalita larev tohoto korýše po 24 hodinovém působení léčiva IBALGIN® 400 mg a jeho standardu. Oba vzorky byly hodnoceny v rozmezí koncentrací 10 mmol/l – 0,17 mmol/l. 24 hodinová inkubace se provádí po naplnění plastové destičky vzorky a larvami *Thamnocephalus platyurus*. Následné hodnocení mortality larev se zhodnotí pomocí stereomikroskopu. Jak léčivo tak standard vykazovaly téměř stejné účinky na larvy tohoto korýše.

Druhý test využívající korýše *Thamnocephalus platyurus* představuje RAPIDTOXKIT. Principem této metody je zhodnocení inhibice

příjmu červených mikrosfér larvami, které jsou staré nejméně 30 hodin. Léčivo i standard působí na larvy po dobu 15 – 30 minut a následuje zhodnocení příjmu mikrosfér pomocí stereomikroskopu. Koncentrace obou látek se nachází v rozmezí 9,6 mmol/l – 0,05 mmol/l. Z výsledků vyplývá, že větší inhibici způsobuje léčivo.

Jako zástupce destruentů byl vybrán nálevník *Tetrahymena pyriformis*. Byl použit opět ve dvou testech.

Pomocí PROTOXKIT F se hodnotí inhibice přeměny substrátu tímto nálevníkem. Testové léčivo, nálevník a pepton jsou vloženy do mikrodestiček a za 24 hodin se odečítá pomocí readeru optická hustota, z níž se následně vypočítá % inhibice. Koncentrace byly stanoveny v rozmezí 7,84 mmol/l - 0,31 mmol/l. Získané hodnoty ukazují, že léčivo způsobuje vyšší inhibici než standard.

Druhý test využívající tohoto nálevníka se nazývá MTT test, který je založen na redukci tetrazolové soli (MTT) mitochondriální dehydrogenasou živých organismů ve formazan. Tato ve vodě nerozpustná barevná látka je následně rozpuštěna pomocí organického rozpouštědla DMSO. Test se opět provádí za využití mikrodestiček a z hodnot optické hustoty se vypočítá inhibice. Koncentrace léčiva i standardu se nachází v rozmezí 5,1 mmol/l - 0,32 mmol/l. Léčivo i standard vykazují přibližně stejnou inhibici. Při srovnání s výsledky z testu PROTOXKIT F lze pozorovat přibližně stejné hodnoty.



## 7 Seznam literatury

Algaltokit F., Freshwater Toxicity Test with Microalgae. Standard Operational Procedure. Creasel, Dinze Belgium, 1996, str.3 - 36

Brun G. L., Bernier M., Losier R. a kol.: Pharmaceutically active compounds in Atlantic canadian sewage treatment plant effluents and receiving waters, and potential for enviromental effects as measured by acute and chronic aquatic toxicity, *Environ. Toxicol. Chem.*, 2006, 25, 2163 – 2176

Centeno M. D. F., Persoone G., Goyvaerts M. P.: Cyst – Based Toxicity Tests. IX The Potential of *Thamnocephalus platyurus* as Test Species in Comparison with *Streptocephalus proboscideus* (Crustacea: Branchiopoda: Anostraca), *Environ Toxicol Water Quality*, 1995, 10, 275 – 282

Cleuvers M.: Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects, *Toxicol Lett*, 2003, 142, 185 – 194

Cleuvers M.: Mixture toxicity of the anti – inflammatory drugs diclophenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid, *Ecotoxicol Environ Saf*, 2004, 59, 309 – 315

Cunningham V. L., Buzby M., Hutchinson T. a kol.: Effects of Human Pharmaceuticals on Aguatic life: Next Steps, *Environ. Sci. Technol.*, 2006, 40, 3456 – 3462

Český Lékopis 2002, (ČL 2002), Pharmacopoea Bohemica MMII (Ph. B. MMII), 3. díl, Evropská část III, Grada Publishing a. s., Praha , 2002, 2898

Dias N., Nicolau A., Carvalho G. S. a kol.: Miniaturization and application of the MTT assay to evaluate metabolic activity of protozoa in the presence of toxicants, *J. Basic Microbiol.*, 1999, 39, 103 – 108

Edmondson J. M., Armstrong L. S., Martinez A.: A rapid and simple MTT – based spectrophotometric assay for determining drug sensitivity in monolayer cultures, *J Tissue Cult Methods*, 1988, 11, 15 – 17

Elliott A. M., Kennedy J. R., Bak I. J.: Macronuclear events in synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*, *J cell Biol*, 1962, 12, 515

Ferrari B., Mons R., Vollat B. a kol.: Environmental risk assessment of six human pharmaceuticals: Are the current environmental risk assessment procedures sufficient for the protection of the aquatic environment,, *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23, 1344 – 1354

Halen P. K., Chagti K. K., Giridhar R. a kol.: Combining Anticholinergic and Anti – inflammatory Activities into a Single Moiety: A Novel Approach to Reduce Gastrointestinal Toxicity of Ibuprofen and Ketoprofen, *Chem Biol Drug Des*, 2007, 70, 450 – 455

Hartl J., Palát K. a kol.: Farmaceutická chemie II, Univerzita Karlova v Praze – Karolinum, 1994, 106 - 107, 109 – 110

Jay A. E.: Toxic Effects of Organic Solvents on the Growth of *Chlorella vulgaris* and *Selenastrum capricornutum*, *Bull Environ Contam Toxicol*, 1996, 57, 191-198

Jones O. A. H., Voulvoulis N., Lester J. N.: Ecotoxicity of pharmaceuticals, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2007, 50, 387 – 424

Kalina T., Váňa J.: Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii, Univerzita Karlova v Praze – Karolinum 2005, 39 – 40, 426, 432, 436, 459, 471

Katzung B. G.: Základní a klinická farmakologie, H & H Vyšehradská s. r. o., Praha, 2006, 568

Knihgt D. J., Thomas M. B. (ed): Practical Guide to Chemical Safety Testing, Repra Technology Limited, UK, 2003, 63

Kočí V., Halousková O. (ed): Ekotoxikologické biotesty 1: sborník pracovní konference: 18. – 19.9.2002 Juniorcentrum, Seč u Chrudimi, Vodní zdroje Ekomonitor, 2002, 3, 8 – 11

Kümmerer K. (ed.): Pharmaceuticals in the enviroment, Springer, 2001, 4 – 5

Latif M., Licek E.: Toxicity Assessment of Wastewaters, River Waters and Sediments in Austria Using Cost – Effective Microbiotests, *Inc Environ Toxicol*, 2004, 19, 302 – 309

Leifertová I., Baloun J.: Farmaceutická botanika Systematika, Státní pedagogické nakladatelství Praha 1990, 14, 20 – 21

Lincová D., Farghali H. (ed) a kol.: Základní a aplikovaná farmakologie, Druhé, doplněné a přepracované vydání, Galén, Praha, 2007, 298 – 300

Liu Y., Peterson D. A., Kimura H. a kol.: Mechanism of cellular 3 – (4, 5 – dimethylthiazol – 2 – yl) – 2, 5 – diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction, *J. Neurochem.*, 1997, 69, 581 – 593

Macek J. a kol.: Farmakoterapie vnitřních nemocí, Grada Publishing, a. s., Praha, 2005, 328

Mikro – verze AISLP – ČR 2009.1

Moissenko T. I.: Aquatic Ecotoxicology: Theoretical Principles and Practical Application, *Water Resour.*, 2008, 35, 530 – 541

Moore N.: Forty years of ibuprofen use, *International journal of clinical practice*, 2003, 135, 28 – 31

Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immunol Meth*, 1983, 65, 55 – 65

Murugan G., Dumont H. J.: Influence of light, DMSO and glycerol on the hatchability of *Thamnocephalus platyurus* Packard cysts, *Hydrobiologia*, 1995, 298, 175 – 178

Nalecz – Jawecki G, Persoone G.: Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Anostracan Crustacean *Thamnocephalus platyurus* – Comparison of Sublethal and Lethal Effect Levels with the 1h Rapidtoxkit and the 24h Thamnotoxkit microbiotests, *Environ Sci & Pollut Res*, 2006, 13, 22 – 27

Nalecz – Jawecki G., Sawicki J.: The Toxicity of Selected Pharmaceuticals to the Protozoa *Spirostomum ambiguum* and *Tetrahymena termophila*, *Fresenius Environ Bull*, 2003, 12, 840 – 843

Narbonne J. F.: History – Biological basis of the use of biomarkers in ecotoxicology; in Lagadic L a kol. (ed.): Use of Biomarkers

for Enviromental Quality Assessment, A. A. Balkema, Rotterdam, Brookfield, 2000, 1 – 7

Nečas a kol.: Obecná biologie pro lékařské fakulty, H & H Vyšehradská, s. r. o., Praha, 2000, 202, 205, 223

Nicolau A., Dias N., Mota M. a kol.: Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment, *Res Microbiol*, 2001, 152, 621 – 630

Nilsson J. R.: Effects of DMSO on vacuole formation contractile vacuole function, and nuclear division in *Tetrahymena pyriformis* gl, *J Cell Sci*, 1974, 16, 39 – 47

Nilsson J. R.: Tetrahymena in Cytotoxicology: with Special Reference to Effects of Heavy Metals and Selected Drugs, *Europ. J. Protistol*, 1989, 25, 2 – 25

Novotná D. (ed.): Úvod do pojmosloví v ekologii krajiny, Ministerstvo životního prostředí ve spolupráci s vydavatelstvím ENIGMA s. r. o., Praha, 2001, 74 – 75

Papáček M, Matěnová V., Matěna J. a kol.: Zoologie, Scientia, spol. s. r. o., Praha, 1994, 26, 74, 76, 256

Pauli W., Berger S., Jaskulka L. a kol.: A case for the inclusion of a protozoan test in aquatic toxicity assessment using *Tetrahymena*, *Sci Total Environ*, 1993, 134, 779 - 786

Persoone G., Marsalek B., Blinova I. A kol.: A Practical and User – Friendly Toxicity Classification System with Microbiotests for Natural Waters and Wastewater, *Environ Toxicol*, 2003, 18, 395 – 402

Poulíčková A., Jurčák J.: Malý obrazový atlas našich sinic a řas, Univerzita Palackého v Olomouci, 2001, 12 – 14, 22 – 23

Protoxkit F. Freshwater toxicity test with a ciliate protozoan. Standard Procedure. Creasel, Dinze, Belgium, 1998, 2 – 19

Radhika M., Walsche Ch. de, Munuswamy N.: Structural and biochemical adaptation in the cryptobiotic cysts of *Thamnocephalus platyurus* (Crustacea: Anostraca), *Cytobios*, 1993, 74, 59 – 64

Rapidtoxkit, microbiotest for rapid detection of water contamination. Standard Procedure. Creasel, Dinze, Belgium, 1995, 2 – 19

Ratte H., Hammers – Wirtz M., Cleuvers M.: Ecotoxicity testing, *Bioindicators and biomonitors*, 2003, 6, 221 – 256

Sauvant M. P., Pepin D., Bohatier J. a kol.: Comparison of six bioassays for assessing in vitro acute toxicity and structure – activity relationship for vinyl chloride monomer, its main metabolites and derivatives, *Sci Total Environ*, 1995a, 172, 79 – 92

Sauvant M. P., Pepin D., Bohatier J. a kol.: Microplate Technique for Screening and Assessing Cytotoxicity of Xenobiotics with *Tetrahymena pyriformis*, *Ecotox Environ Saf*, 1995b, 32, 159 – 165

Sauvant M., Pepin D., Piccinni E.: *Tetrahymena pyriformis*: a tool for toxicological studies, *Chemosphere*, 1999, 38, 1631 – 1669

Sedlák E.: Zoologie bezobratlých, Masarykova univerzita, přírodovědecká fakulta Brno 2000, 24 - 26, 83 - 86

Sládeček V., Sládečková A., Ambrožová J.: *Thamnocephalus platyurus* jako testovací organismus, Sborník konference „Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí“, Chelčice, 1997, 96 – 99

Svoboda J. a kol.: Organická chemie I, Vysoká škola chemicko – technologická v Praze, 2005, 236

Thamnotoxkit F. Crustacean Toxicity Screening Test for Freshwater<sup>1</sup> Standard Operational Procedure, Creasal, Dinze, Belgium, 1995, 2 – 28

Törökne A.: Comparison of the 1 hour and the 24 hour toxicity tests with *Thamnocephalus platyurus* larvae on environmental and spiked sample, *Fresenius Environ Bull*, 2006, 15, 1076 - 1080

Tsiridis V., Persoone G.: Toxkit microbiotests: New low cost tools for hazard detection/monitoring in environmental toxicology, Proceedings of the International Conference „Protection and Restoration of the Environment VI“ Skiathos, July 1 – 5, 2002, 809 – 816

Vellonen K. S., Honkakoski P., Urtti A.: Substrates and inhibitors of efflux proteins interfere with the MTT assay in cells and may lead to underestimation of drug toxicity, *Europ J Pharm Sci*, 2004, 23, 181 – 188

Vokurka M., Hugo J. a kol.: Velký lékařský slovník, 6. aktualizované vydání, MAXDORF s. r. o., Praha, 2006, 78, 203, 205, 246, 258, 306, 616, 701, 765

Wadhia K., Thompson K. C.: Low – cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the Water Framework Directive, *Trends Anal Chem*, 2007, 26, 300 – 306

Zicháček V.: Zoologie, FIN, Olomouc, 1995, 25, 74, 76, 250

Zilberg D., Sinai T.: Optimalization and validation of a colorimetric assay for *Tetrahymena* sp. Surfoval, *Res Microb*, 2006, 157, 355 – 359

### **Elektronické zdroje:**

(1) <http://aplikace.mvcr.cz/archiv2008/sbirka/1997/sb026-97.pdf>, 2009-02-03

(2) [http://www.env.cz/\\_\\_c1256e7000424ac6.nsf/Categories?OpenView&Start=1&Count=30&Expand=10#10](http://www.env.cz/__c1256e7000424ac6.nsf/Categories?OpenView&Start=1&Count=30&Expand=10#10), 2009-05-3

(3) <http://www.mfe.govt.nz/publications/water/whole-effluent-toxicity-nov98/whole-effluent-toxicity-appendix-4-nov98.pdf>, 2009-04-15

(4) <http://www.lifesciences.napier.ac.uk/algalweb/selenast-a.jpg>, 2009-03-15

(5) <http://www.microbiotests.be/toxkits/thamnotoxkit.pdf>, 2009-03-15

(6) <http://www.eol.org/pages/485136>, 2009-03-15



## Abstrakt

**Střílková Dagmar, Ekotoxikologická studie vybraného léčiva, diplomová práce**

**Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra Farmaceutické botaniky a ekologie**

Ibuprofen, účinná látka léčiva IBALGIN® 400 mg, patří k široce používaným nesteroidním antiflogistikům. Používá se především k léčbě zánětlivých onemocnění. Renální exkrece je nejdůležitější cestou konečné eliminace. Touto cestou se může ibuprofen dostat do povrchové, podzemní a pitné vody. Kvůli interpretaci výsledků na působení na životní prostředí, byla akutní toxicita tohoto léčiva hodnocena na organismech všech trofických úrovní. Jako zástupce producentů byla vybrána zelená řasa *S. capricornutum* v 72 hodinovém testu inhibice růstu ALGALTOXKIT F. Z řad producentů byl použit korýš *T. platyurus* ve dvou dalších testech. Pomocí 24 hodinového testu THAMNOTOXKIT F se zjišťuje mortalita larev tohoto korýše a RAPIDTOXKIT hodnotí inhibici příjmu potravy korýšem. Na zástupci destruentů nálevník *T. pyriformis* byly provedeny 2 testy. PROTOXKIT F hodnotí inhibici růstu tohoto nálevníka. MTT test je založen na redukci tetrazolové soli, MTT, mitochondriální dehydrogenasou životaschopných buněk ve formazan. Některé testy byly zaměřeny na zjišťování mortality, jiné na zjišťování inhibice. Nejvyšší mortalitu vykazoval test PROTOXKIT F. Naopak nejnižší nejnižší inhibice měl test THAMNOTOXKIT F.

**Klíčová slova:** ibuprofen, ekotoxicita, *S. capricornutum*, *T. platyurus*, *T. pyriformis*

## **Abstract**

**Dagmar Střílková, Ecotoxicological study of the select drug, diploma work**

**Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Botany and Ecology**

Ibuprofen, the effective substance of drug IBALGIN® 400 mg, belongs to widely used nonsteroidal antiinflammatory drugs. It is primary used to treat most of the inflammatory illnesses. The renal excreting is the most important way of the final elimination. Ibuprofen can get into surface, ground and drinking water. Because of the interpretation of the result for impact on enviroment, the acute toxicity of this pharmaceutical was evaluated on organism of all the trophic levels. The green alga *S. capricornutum* was chosen like the representative of the procedurs, which is used in 72 hour growth inhibition test ALGALTOXKIT F. Crustacean *T. platyurus* of the series of the consumers was used in 2 next tests. The mortality of the larva of this crustacean is found out by means of 24 hour test THAMNOTOXKIT F. RAPIDTOXKIT evaluates the inhibition of the food receiving by the crustacean. 2 tests were done on the representative of the decomposer, *T. pyriformis*. PROTOXKIT F evaluates the growth inhibition of this ciliate. MTT bioassay is based on the reduction of tetrazolium salt (MTT) by the mitochondrial dehydrogenase of viable cells in formazan. Same of the tests were intended on the finding out the mortality, others found out the inhibition. PROTOXKIT F test presented the biggest mortality. On the contrasy THAMNOTOXKIT F test had the lowest inhibition.

Key word: ibuprofen, ecotoxicity, *S. capricornutum*, *T. platyurus*, *T. pyriformis*